

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

**Glukokinase als ein neues Zielgen des kanonischen Wnt-
Signalwegs in Insulinproduzierenden β -Zellen des
Pankreas**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Johannes Wölk

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Scherbaum

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Meißner

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosin-Triphosphat
AXIN	Axis Inhibitor
BCL	B-Cell Lymphoma
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP	CREB Binding Protein
CK	Creatin-Kinase
CSNK	Casein-Kinase
CTRL	Kontrolle (ConTRoL)
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCCM	Fettzell-konditioniertes Medium
GK	Glukokinase
GLUT	Glukosetransporter
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3
HDL	High Density Lipoprotein-Cholesterin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFG	Impaired Fasting Glucose
IKK	IkappaB Kinase
IL	Interleukin
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JNK	Jun Kinase
LDL	Low Density Lipoprotein-Cholesterin
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young

mRNA	messenger-RNA
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (red.)
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatpuffer
pPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
RNA / RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sFRP-1	secreted Frizzled-related Protein 1
TCF	T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor
TCF7L2	T-cell transcription factor 7-like 2
TF	TOPFLASH
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
WHO	World Health Organisation

Danksagung

Für die Vergabe der äußerst interessanten Aufgabenstellung, die umfassende wissenschaftliche Betreuung und fruchtbare Anregungen und Diskussionen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med W.A. Scherbaum bedanken, wie auch Herrn PD Dr. med. Sven Schinner, in dessen Arbeitsgruppe ich die Arbeit durchführen durfte.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	3
Danksagung.....	5
1 Einleitung.....	8
1.1 Die Regulation des Glukosehaushalts.....	8
1.2 Fettzellen und ihre Funktionen.....	10
1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg.....	11
1.3 Adipositas.....	14
1.4 Das Metabolische Syndrom.....	14
1.5 Diabetes mellitus.....	15
1.6 Glukokinase.....	16
1.7 Fragestellung.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Zelllinie.....	18
2.1.2 Material und Geräte.....	18
2.1.3 Zellkultur.....	18
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.5 Plasmidkonstrukte	20
pcDNA3.....	21
2.1.6 konditionierte Medien.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Kultivierung von INS-1 Zellen.....	23
2.2.2 Transiente Transfektion.....	23
2.2.3 Dual-Luciferase-Assay.....	24
2.2.4 Isolation und Kultivierung von humanen Fettzellen.....	25
2.2.5 Präparation von FCCM.....	25
2.2.6 Statistik.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Etablierung und Optimierung der transienten Transfektion.....	26
3.2 Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs in INS-1 Zellen.....	28

3.3 Untersuchung der Regulation der GK-Expression durch den kanonischen Wnt-Signalweg.....	30
3.4 Einfluss von β -Catenin und pPAR γ auf die GK-Expression.....	32
3.5 Einfluss von Troglitazon auf die GK-Expression.....	34
3.6 Untersuchung der Wirkung von FCCM auf die GK-Expression.....	36
4 Diskussion	38
5 Zusammenfassung.....	46
6 Lebenslauf.....	48
7 Literaturverzeichnis.....	49

1 Einleitung

1.1 Die Regulation des Glukosehaushalts

Jeder Organismus benötigt Energie. Unentbehrlich für den menschlichen Körper ist die Versorgung mit Glukose, die eine entscheidende Rolle als Energieträger und –lieferant im Körper einnimmt. Um die kontinuierliche Versorgung insbesondere der völlig vom Glukosestoffwechsel abhängigen Zellen des Nervensystems trotz Wechsel zwischen Nahrungszufuhr und Fastenzeiten zu gewährleisten, reguliert der Körper seinen Blutglukosespiegel. Der Bereich, in dem die Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen oder die klassischen Diabetes-Folgeerkrankungen (z.B. Polyneuropathie, Augenschäden,...) signifikant geringer ausfallen, wird als Normoglykämie bezeichnet. Dies entspricht einem Wert zwischen **70 und 109 mg/dl** (Nüchternblutzucker), bei 110-125 mg/dl beginnt die gestörte Nüchternglukose (Impaired Fasting Glucose, IFG) (World Health Organization 15.09.2009 – WHO | Diabetes).

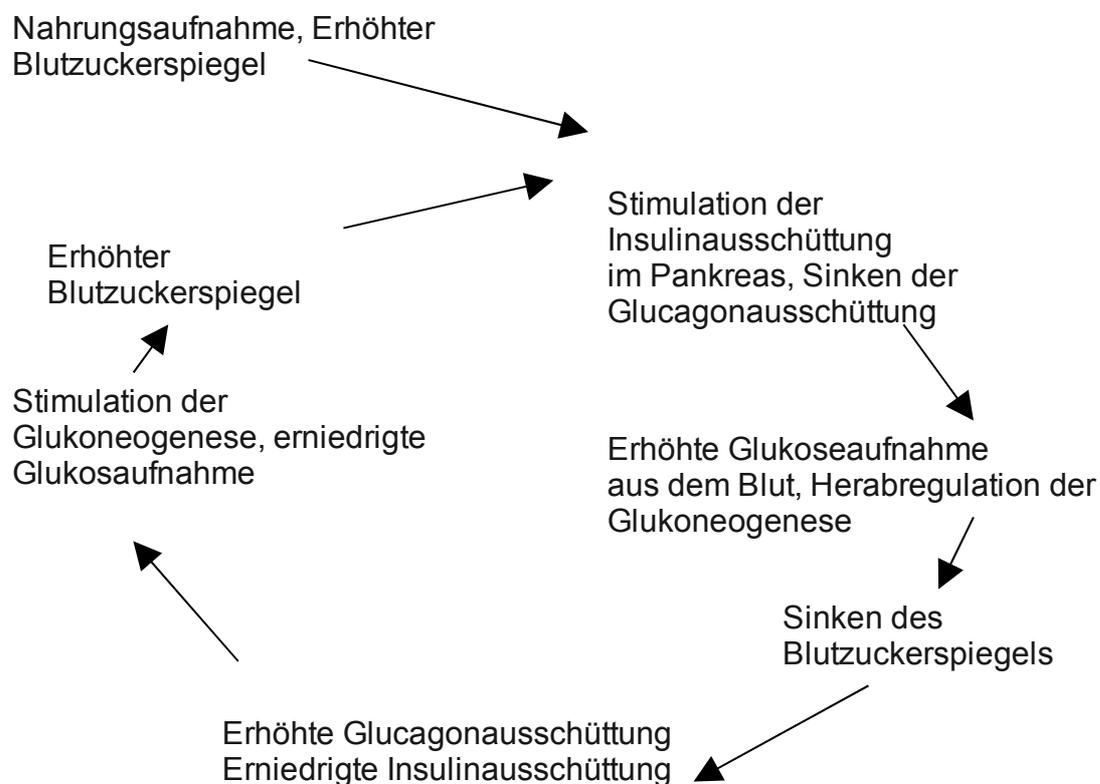


Abb. 1 – Regelkreis Blutglucosegehalt

Den Hauptteil dieses Regelkreises übernimmt das Zusammenspiel zwischen den Hormonen Insulin und Glucagon, die im Pankreas gebildet werden und die Aufnahme, Speicherung, Metabolisierung und Abgabe von Glukose in peripheren Geweben beeinflussen.

Nach einer Mahlzeit steigt der Blutglukosespiegel in Folge der Aufnahme aus dem Darmlumen, konsekutiv wird von den Beta-Zellen des Pankreas Insulin freigesetzt. (Dietel, Suttorp et al. 2005 – Harrisons Innere Medizin)

Insulin bindet an den Insulinrezeptor, aktiviert eine Autophosphorylierung des Rezeptors und folgend eine Phosphorylierungskaskade, und bewirkt eine Hochregulation der Glukosetransportproteine und eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit derselben (Dietel, Suttorp et al. 2005 – Harrisons Innere Medizin). Bei einem Abfall des Glukosespiegels bewirkt der Antagonist Glukagon u.a. eine verstärkte Gluconeogenese in der Leber, was zu einem erneuten Anstieg der Glukose führt.

Störungen des Insulinhaushalts führen bei Hyperinsulinämien zu hypoglykämien (=verringertes Blutzuckergehalt) Zuständen, bei Hypoinsulinämien oder Resistenz gegen das Hormon zu Hyperglykämie. Resistenz gegen die Effekte oder Insulinmangel führen zum Krankheitsbild des Diabetes mellitus (World Health Organisation Department of Noncommunicable Disease Surveillance 1999 – Definition) mit Hyperglykämie, Glukosurie und seinen akuten (Ketoazidose, Coma diabeticum) und chronischen Folgekomplikationen, wie z.B. Kardiovaskuläre Erkrankungen, Nierenschäden, Polyneuropathie, etc, dem sogenannten Typ 2 Diabetes. Verschiedene Mechanismen für eine Insulinresistenz im Rahmen des Metabolischen Syndroms werden diskutiert. (Barzilai, She et al. 1999 – Surgical removal of visceral fat; Barbuio, Milanski et al. 2007 – Infliximab reverses steatosis and improves)

Neben der Insulinresistenz können verschiedene Mechanismen zu einem Insulinmangel führen. Das Schlüsselenzym für das Glukosesensing der Betazelle ist die - in dieser Studie untersuchte - Glukokinase (Matschinsky 1990 – Glucokinase as glucose sensor), eine Hexokinase, die als Glukosesensor in Betazellen fungiert.

In der Betazelle führt ein erhöhtes Level an Blutglukose zu proportional gesteigerter Glykolyse und nachfolgend erhöhtem NAD(P)H und Verschluss der ATP-sensitiven K⁺-Kanäle. Es schließt sich ein erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel an und die Ausschüttung von Insulin aus den Speichergranula (Henquin 2000 – Triggering and amplifying pathways).

Missensemutationen im Gen für dieses Enzym führen zu einer herabgesetzten Aktivität, hierdurch über eine geringere Insulinausschüttung zum Bild des Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), einer DM Typ 2 Variante, die bereits bei Jugendlichen auftritt (Gidh-Jain, Takeda et al. 1993 – Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent).

1.2 Fettzellen und ihre Funktionen

Adipozyten teilen sich in uni- und plurivakuoläre Fettzellen auf, von denen nur die univakuolären eine Rolle für die Adipositas spielen – plurivakuoläre Adipozyten (sog. Braunes Fettgewebe) spielt eine Rolle bei der Thermoregulation von Säuglingen und Winterschlaf haltenden Tieren, sowie nach neuesten Ergebnissen wohl auch im Stoffwechsel erwachsener Menschen. (Cypess, Lehman et al. 2009 – Identification and importance of brown; Nedergaard, Bengtsson et al. 2007 – Unexpected evidence for active brown)

Univakuoläre Adipozyten finden sich als Baufett an Fußsohle, Nierenlager, etc., und als energiespeicherndes Depotfett in der Subkutis, an Gesäß und intraperitoneal, wobei die Anteile an intraperitonealem Fettgewebe schlecht mit dem Gesamtfettanteil korrelieren (Ludescher, Machann et al. 2009 – Correlation of Fat Distribution). Intraperitoneales Fett zeigt eine höhere Kapazität, freie Fettsäuren freizusetzen und Glukose aufzunehmen als Abdominales Subkutanfett und stellt einen besseren Prädiktor für die Mortalität dar (Ibrahim 2009 – Subcutaneous and visceral adipose tissue; Fox, Hwang et al. 2009 – Relation of subcutaneous and visceral). Des weiteren schütten die Zellen des viszeralen Fetts proinflammatorische Mediatoren aus wie TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6, Leptin, Adiponectin, und Resistin (Hotamisligil, Peraldi et al. 1996 – IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor, Steppan, Bailey et al. 2001 - The hormone resistin links obesity).

Seit der Entdeckung des Leptins (Zhang, Proenca et al. 1994 – Positional cloning of the mouse) ist klar, daß Adipozyten auch als endokrines Organ aktiv sind. Die von ihnen produzierte Signalmoleküle werden in der Klasse der Adipokine oder Adipozytokine zusammengefasst (MacDougald, Burant 2007 – The rapidly expanding family; Monzillo, Hamdy et al. 2003 – Effect of lifestyle modification).

Adipozytokine sind in der Lage, eine Antwort in Betazellen hervorzurufen (Rhodes 2005 – Type 2 diabetes-a matter). Studien haben gezeigt, daß Adipozyten Wnt-Signalmoleküle ausschütten, um die Adipozytendifferenzierung zu regulieren (Ross, Hemati et al. 2000 – Inhibition of adipogenesis by Wnt; Longo, Kennell et al. 2002 – Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes; Christodoulides, Laudes et al. 2006 – The Wnt antagonist Dickkopf-1). In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, daß Wnt3a und Wnt10b von reifen humanen Adipozyten ausgeschüttet werden, und in vitro die Hormonausschüttung von Nebennierenrindenzellen regulieren (Schinner, Willenberg et al. 2007 – Adipocyte-derived products induce the transcription).

1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Wnts sind Liganden für „serpentine Frizzled Receptors“ - G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Malbon 2004 – Frizzleds: new members), und LDL-rezeptor verwandte (LRP) Corezeptoren. Sobald ein Ligand an beide Rezeptoren gebunden hat, wird der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert, resultierend in einer Stabilisierung von β -Catenin:

In Anwesenheit von Wnt blockiert dishevelled (Dsh) den Abbau von β -Catenin durch Blockade von Casein kinase α (CKI α) und/oder CKI ϵ sowie den nachfolgenden GSK3 / APC / Axin - Komplex, die in Abwesenheit von Wnt β -Catenin am Serinrest 45 phosphorylieren und damit den Abbau von β -Catenin in Proteasomen über Ubiquitylierung verursachen. (Huelsenken, Behrens 2002 – The Wnt signalling pathway)

Wenn kein Wnt-Signal vorliegt wird β -Catenin durch GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3) dem Abbau zugeführt. GSK3 stellt einen Teil eines Multiproteinkomplexes dar, welcher das Protein AXIN (Axis Inhibitor), APC (Adenomatous Polyposis Coli), CSNK1 (Casein Kinase-1) und β -Catenin umfasst und mit den Cadherinen entlang der Membranen lokalisiert ist (Yanagawa, Matsuda et al. 2002 – Casein kinase I

phosphorylates; Amit, Hatzubai et al. 2002 – Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin).

Diese Proteine helfen GSK3, das Signalmolekül β -Catenin effizient zu phosphorylieren, wodurch es für die Ubiquitylierung markiert wird und in Proteasomen abgebaut. Ein Wnt-Signal sorgt über die Blockade des β -Catenin-Abbaus für einen erhöhten β -Catenin-Level in der Zelle.

β -Catenin kann mit der Histon-Acetyl-Transferase CBP (CREB Binding Protein) interagieren, dem Chromatin-Remodeling-Komplex SWI/SNF (Barker, Hurlstone et al. 2001 – The chromatin remodelling factor Brg-1) und an Pygopus gebundenem BCL9. (Townsend, Cliffe et al. 2004 – Pygopus and Legless target Armadillo/ β -catenin; Kramps, Peter et al. 2002 – Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment; Tolwinski, Wieschaus 2004 – A nuclear function for armadillo/ β -catenin) Hieraufhin coaktiviert β -Catenin u.a. die Transkriptionsfaktoren der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktorfamilie (TCF) und lymphoid-enhancer-binding-Familie (LEF) bei kanonischen Wnt-Zielgenen (Logan, Nusse 2004 – The Wnt signaling pathway).

Vor kurzem wurde gezeigt, daß Polymorphismen innerhalb des gene encoding T-Cell like transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) mit einem erhöhten Risiko für Typ 2 Diabetes beim Menschen assoziiert ist. Die Mechanismen hingegen, durch die TCF7L2 den Glukose-Stoffwechsel beeinflusst, sind unklar (Grant, Thorleifsson et al. 2006 – Variant of transcription factor 7-like; Florez, Jablonski et al. 2006 – TCF7L2 polymorphisms and progression).

Frizzled-Rezeptoren und LRP-Corezeptoren werden in pankreatischen Betazellen exprimiert (Heller, Klein et al. 2003 – Expression of Wnt; Fujino, Asaba et al. 2003 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 5; Papadopoulou, Edlund 2005 – Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic).

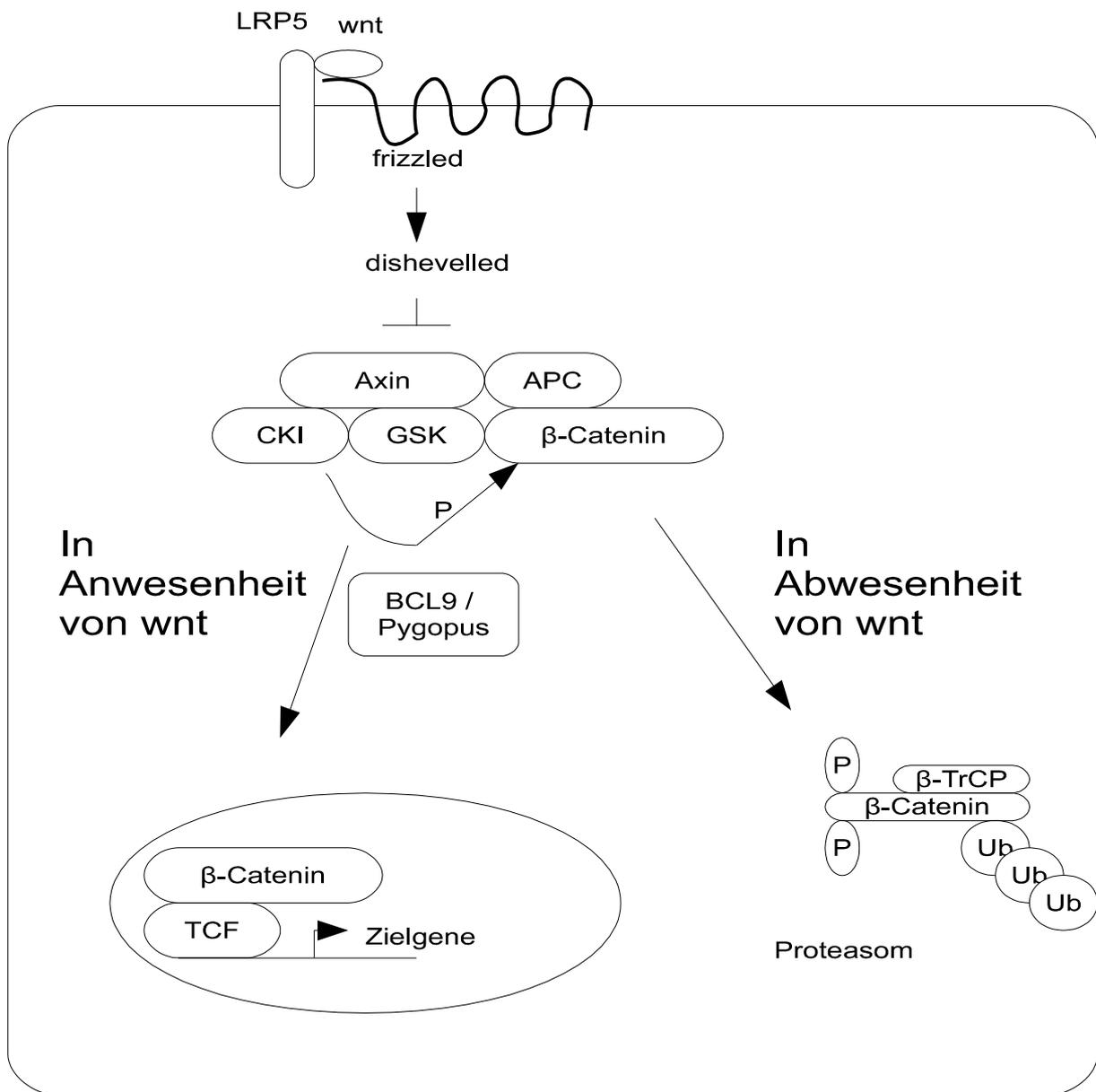


Abb. 2 – Der kanonische Wnt-Signalweg (modifiziert nach Huelsken, Behrens 2002 – The Wnt signalling pathway)

1.3 Adipositas

Übergewicht ist nach WHO definiert als ein Body-Mass-Index (=BMI) von $> 25 \text{ kg/m}^2$, Fettleibigkeit (Adipositas) beginnt bei einem BMI von $>30 \text{ kg/m}^2$ und ist in drei Grade unterteilt. (World Health Organization 2000 – Obesity)

Konsequenzen der erhöhten Körperfettmasse können unter anderem Kardiovaskuläre Komplikationen, Typ 2-Diabetes und diverse Tumorerkrankungen sein (Haslam, James 2005 – Obesity).

Eine verminderte Kalorienzufuhr mit konsekutiver Massereduktion führt im Tiermodell zu einer verlängerten Lebensdauer (Koubova, Guarente 2003 – How does calorie restriction work), Mäuse mit einem erhöhten Körperfettanteil zeigen eine verringerte Lebensdauer (Smith, Edwards et al. 1991 – Body weight and longevity). Diverse Mechanismen hierfür werden diskutiert (Lee, Yu 1990 – Modulation of free radicals; Kahn, Flier 2000 – Obesity and insulin resistance; Unger 2003 – The physiology of cellular liporegulation).

Adipositas kann eine Insulinresistenz hervorrufen. Der genaue Pathomechanismus ist unbekannt, diskutiert werden unter anderem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-Alpha) (Hotamisligil, Spiegelman 1994 – Tumor necrosis factor alpha), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (PAI-I) (Juhan-Vague, Alessi 1993 – Plasminogen activator inhibitor 1), Jun Kinase 1 (JNK1) (Solinas, Vilcu et al. 2007 – JNK1 in hematopoietically derived cells) sowie das Hormon Resistin und verschiedene Adipokine (Steppan, Bailey et al. 2001 – The hormone resistin links obesity, Hotamisligil, Peraldi et al. 1996 – IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor).

1.4 Das Metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom fasst einen Cluster von unterschiedlichen Veränderungen zusammen: Diabetes, erhöhter Nüchternblutzucker, stammbetonte Adipositas, hohes Cholesterin und hoher Blutdruck (The IDF consensus worldwide definition).

Im Rahmen des Metabolischen Syndroms ist Übergewicht häufig assoziiert mit Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Betazell-Hyperplasie (Yoon, Ko et al. 2003 – Selective β -cell loss and alpha-cell; Klöppel, Löhner et al. 1985 – Islet pathology and

the pathogenesis; Weir, Bonner-Weir 2004 – Five stages of evolving beta-cell; Butler, Janson et al. 2003 – Beta-cell deficit and increased beta-cell; Rhodes 2005 – Type 2 diabetes-a matter). Hyperinsulinämie kann entweder aus Inselhyperplasie resultieren, oder aus Hypersekretion von Insulin aus der individuellen Betazelle. Hyperinsulinämie kompensiert eine Insulinresistenz, um Normoglykämie zu gewährleisten. Auf der anderen Seite verschlechtert Hyperinsulinämie per se eine Insulinresistenz (Rizza, Mandarino et al. 1985 – Production of insulin resistance), und wird verantwortlich gemacht für die Progression des Metabolischen Syndroms (Steneberg, Rubins et al. 2005 – The FFA receptor GPR40; Medina-Gomez, Vidal-Puig 2005 – Gateway to the metabolic syndrome). Die Mechanismen, die Übergewicht und Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie und Betazellhyperplasie verbinden, sind noch nicht komplett verstanden. Diskutiert werden unter anderem Lipidakkumulation in Skelettmuskelzellen und Leber, die die Serin-Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) über z.B. TNF- α , Proteinkinase C, IKK- β oder JNK1 aktivieren (Savage, Petersen et al. 2005 – Mechanisms of insulin resistance, Solinas, Vilcu et al. 2007 – JNK1 in hematopoietically derived cells).

1.5 Diabetes mellitus

Störungen der Insulinproduktion /-Wirkung werden klassifiziert in die Hauptkategorien Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2.

Der Diabetes mellitus Typ 2 umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen Insulinresistenz, gestörte Insulinsekretion sowie eine gesteigerte Glukoseproduktion bestehen. Die Prävalenz liegt nach einem WHO-Bericht bei 85% der gesamten Diabeteserkrankungen, 90% der an Typ 2 Diabetes erkrankten sind übergewichtig oder adipös. (World Health Organization 2000 – Obesity)

Auch Störungen im Bereich des Glukosesensings haben auf Grund des oben vorgestellten Regelkreises das Krankheitsbild des DM Typ II (Maturity-onset Diabetes of the young, MODY) zur Folge (Stern, Strihan et al. 2007 – Four novel mutations).

1.6 Glukokinase

Glukokinase (Hexokinase IV) ist ein Enzym, daß speziell D-Glucose in Glucose-6-Phosphat umsetzt. Im Pankreas ist es der Glukosesensor und das Schlüsselenzym der Insulinsekretion. (Matschinsky 1990 – Glucokinase as glucose sensor)

Dies wird durch zwei wichtige kinetische Eigenschaften der Glukokinase ermöglicht: Zum einen hat Glukokinase eine niedrigere Affinität zu Glukose als andere Hexokinasen, und verändert Konformation und Funktion mit steigender Glukosekonzentration im physiologisch wichtigen Bereich von 4-10 mmol/L (72-180mg/dl). Das Enzym ist bei einer Konzentration von annähernd 8 mmol/L halbgesättigt.

Zum andern wird Glukokinase nicht durch ihr Endprodukt, Glukose-6-phosphat, inhibiert – dadurch kommt es auch bei durchgehend hohen Glukoseleveln zu einem kontinuierlichen Signal; und nachfolgend zu einer Insulinausschüttung, und hierdurch zu einem angebotsbasierten metabolischen Weg. (Bell, Cuesta-Munoz et al. 2002 – Glucokinase; Matschinsky 1996 – Banting Lecture 1995)

Der Promotor des Glukokinasegens enthält ein PPRE (pPAR Response-Element). (Kim, Cha et al. 2002 – Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase)

pPAR- γ

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind intrazelluläre Rezeptoren, die nach Bindung eines Liganden die Transkription eines Gens regulieren. PPARs binden an das *PPAR response element* (PPRE), eine spezifische DNA-Sequenz. Ursprünglich in *Xenopus*-Fröschen als Rezeptoren identifiziert, die die Proliferation von Peroxisomen anregen (Dreyer, Krey et al. 1992 – Control of the peroxisomal beta-oxidation), fanden sich PPREs (mit der Konsensussequenz AGGTCA X AGGTCA, wobei X für ein beliebiges Nukleotid steht) in zahlreichen anderen Genen, so auch im Promotor des Glukokinasegens. (ibid.; Kim, Kim et al. 2004 – Liver glucokinase can be activated).

Verschiedene Mechanismen, unter anderem die Wirkung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α), und auch Insulin selbst, führen zu einer Down-Regulation der Insulinwirkung an der Zielzelle (im Falle von Insulin u.a. durch Herabregulation der

GLUT4-Expression in der Muskelzelle). (Hotamisligil 1999 – Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance; Flores-Riveros, McLenithan et al. 1993 – Insulin down-regulates expression)

Kommt es zum Ungleichgewicht zwischen Abnehmender Wirkung des Insulinsignals und Mechanismen mit gegenläufiger Wirkung, muss die Insulinsekretion für eine gleiche Wirkung gesteigert werden.

Die Unfähigkeit der Betazellen, mit der Insulinresistenz Schritt zu halten, markiert den Übergang von Insulinresistenz zum manifesten Typ II Diabetes. (McGarry 2002 – Banting lecture 2001)

1.7 Fragestellung

Beim Metabolischen Syndrom liegen neben einem Diabetes und einer Insulinresistenz in vielen Fällen eine Stammfettsucht und / oder eine Hypertriglycerinämie vor.

Adipozyten sezernieren Signalmoleküle, die in Zielzellen, darunter Betazellen des Pankreas, eine Antwort hervorrufen. Wnt-Signalmoleküle wurden vor kurzem als neue von Adipozyten ausgeschüttete Faktoren identifiziert. Sie regulieren ebenfalls die Insulinsekretion und den Zellzyklus in Betazellen.

Fujino et al. haben gezeigt (Fujino, Asaba et al. 2003 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 5), daß LRP-5 Knockout-Mäuse ein Krankheitsbild ähnlich dem menschlichen Diabetes mellitus Typ 2 mit Insulinresistenz entwickeln, hierbei fiel eine verringerte Insulinsekretion wie auch mRNA-Menge für unter anderem Glukokinase in den Betazellen der untersuchten Mäuse auf. (ibid.) Kim, Cha et al. haben gezeigt, daß der Promotor der Glukokinase ein PPRE enthält (Kim, Cha et al. 2002 – Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase)

Das Ziel dieser Studie war, zu untersuchen, ob von Fettzellen ausgeschüttete Wnt-Signalmoleküle auf Betazellen einwirken und die Identifikation des Zielgens des kanonischen Wnt-Signalwegs in Bezug auf die Regulation der Insulinausschüttung und eines möglichen Mechanismus dieser Interaktion in β -Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Die Versuche wurden mit einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) durchgeführt. Es handelt sich bei den INS-1 Zellen um partiell Glukose-sensitive Zellen, die von Prof. Seißler (Universität München) zur Verfügung gestellt wurden.

Bei INS-1 Zellen handelt es sich um eine Ratten-Insulinoma-Zelllinie, deren Funktion und Morphologie sehr stark den nativen Betazellen ähnelt (Asfari, Janjic et al. 1992 – Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting).

2.1.2 Material und Geräte

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeiten fanden unter einer Laminar Air Flow Sicherheitsbank der Klasse II statt.

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120°C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

2.1.3 Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fötale Kälberserum	Seromed, Berlin, Deutschland
Glibenclamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mycoplasma Detektionskit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Phosphat-Puffer (PBS)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Trypsinlösung	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Molekularbiologie

E. coli (Subcloning Efficiency DH5),	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Agarose MP	Roche, Mannheim, Deutschland
Ampicillin	Roche, Mannheim, Deutschland

Medien

RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium (mit 2 g/l D-Glukose und 0,3 g/l L-Glutamin) 10% fötales Kälberserum 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung
-------------	---

Lysepuffer	0,2 M Natriumhydroxid (High Pure Plasmid Isolation Kit) 1% SDS
------------	---

PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,4 mM Kaliumhydrogenphosphat
-----	--

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Einfrigerbox	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einwegpipetten (1-25 ml)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorf-Caps (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plasmid Maxi Kit 25	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 + 250 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6- + 24-Loch)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 + 50 ml)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Geräte

Autoklav Typ 23	Melag, Berlin, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Harnau, Deutschland
Brutschrank D&D 6220	Heraeus Instruments GmbH, Harnau, Deutschland
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold, Bundoora, Australien
Neubauer-Zählkammer	Brand (Merck), Darmstadt, Deutschland
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler Thermoshaker	Gerhardt
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3 K 30	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.5 Plasmidkonstrukte

Die Plasmidkonstrukte wurden mittels Plasmid Maxi-Kit nach Herstellerangaben vervielfältigt.

TOPFLASH

Das TOPFLASH-Plasmid ist ein TCF-Luziferase-Reporterplasmid, das eine firefly-Luziferase codiert. Es enthält zwei Sets von drei Kopien der TCF-Bindungsstelle stromaufwärts des Thymidinkinase Minimalpromotors. Das Plasmid FOPFLASH enthält mutierte TCF-Bindungsstellen, und dient als Negativkontrolle. Beide Plasmide sind kommerziell erhältlich (Upstate, Cell Signalling Solutions, Charlottesville, VA, USA).

β-Catenin S45A

Die konstitutiv aktive Mutante des β-Catenin, S45A, wurde erzeugt von T.Hagen (Wolfson Digestive Diseases Centre, University of Nottingham, UK), wie vorhergehend beschrieben (Hagen, Sethi et al. 2004 – Signalling activity of beta-catenin targeted). Die cDNA, die die Ser45->Ala -Mutation trägt, wurde in den pcDNA3 Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingebracht.

PPAR- γ

Der Expressionsvektor für pPAR- γ enthält das cDNA-Transkript des Gens in voller Länge, wie bereits beschrieben.

(Schinner, Dellas et al. 2002 – Repression of glucagon gene transcription).

pRL-TK / Renilla

Das Plasmid pRL-TK (Promega, Mannheim, Deutschland) dient als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz. Der Vektor enthält eine cDNA, die *Renilla* – Luziferase unter der Kontrolle des Herpes simplex Virus – Thymidinkinase-Promotors codiert.

pRGP 1003 / GK

Das Glukokinasereporter gen trägt einen Luziferase-Reporter unter der Kontrolle des Ratten-Glukokinase-Promotors, -1003/+196 der Betazell-spezifischen Gene umfassend (Cha, Kim et al. 2001 – HNF1 and/or HNF3 may contribute).

pcDNA3

Das Leerplasmid pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) wurde zur Balancierung der transfizierten DNA-Menge verwendet.

ZELLEN

INS-1

Die Ratten-Insulinom-Linie INS-1 wurde bereits beschrieben in (Seissler, Nguyen et al. 2000 – Regulation of the diabetes-associated autoantigen).

2.1.6 konditionierte Medien

Menschliches Gewebe

Gewebsproben von menschlichem weißem Fettgewebe wurden von Frauen (20-35 Jahre) erhalten, die eine chirurgische Mammareduktion erhielten (n=10). Diese Patienten waren ansonsten gesund und frei von endokrinen oder metabolischen Störungen und Erkrankungen.

Der BMI der Spenderinnen lag zwischen 21,4 und 29,2 kg/m² (25,4±2,8, Mittelwert±Standardabweichung). Die Patientinnen erteilten ihre Einwilligung, nachdem die Prozedur ihnen erklärt wurde, und die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland (Studiennummer 2292) genehmigt.

Fettzellkonditioniertes Medium / Fat-Cell Conditioned Medium (FCCM)

Die Isolierung und Zubereitung von FCCM wurde bereits beschrieben (Ehrhart-Bornstein, Lamounier-Zepter et al. 2003 – Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors).

In dieser Arbeit wurde für 24 h mit isolierten menschlichen Fettzellen konditioniertes DMEM/F12 Medium verwendet. Als Kontrollmedium diente DMEM/F12-Medium mit äquivalent eingestellter Glukosekonzentration.

Wnt3a-konditioniertes Medium aus L-Zellen

Die Zubereitung von konditioniertem Medium aus Wnt3a-sezernierenden L-Zellen wurde bereits beschrieben (Shao, Cheng et al. 2005 – Msx2 promotes cardiovascular calcification). Wnt3a-produzierende L-Zellen wurden von der American Type Culture Collection erhalten (CRL2647, Kontakt durch LGC Promochem, Wesel, Deutschland). Konditioniertes Medium von L-Zell-Wildtypen (CRL2648) diente als Negativkontrolle.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von INS-1 Zellen

Die INS-1 Zelllinie wurde unter sterilen Bedingungen im Inkubationsschrank (Heraeus DBD6220) bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden adhärent wachsend in RPMI 1640 Medium in unbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert, wie in (Seissler, Nguyen et al. 2000 – Regulation of the diabetes-associated autoantigen) beschrieben.

Das verwendete Medium wurde um die Antibiotika Penicillin (1U/ml) und Streptomycin (1µg/ml), sowie L-Glutamin (2mM) und 10% Fötalem Kälberserum (FCS) ergänzt und vor Verwendung ebenfalls auf 37° vorgewärmt.

Bei einer Konfluenz von 80% wurden die adhärennten Zellen gesplittet und subkultiviert. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 10ml PBS Puffer gewaschen, auch der PBS-Puffer wurde entfernt. Durch Inkubation in einer Trypsinlösung (500µg/ml + 2mg/ml EDTA in physiologischer Kochsalzlösung (Gibco BRL)) über 1 Minute wurden die Zellen abgelöst.

Die Zellen wurden mit dem Kultivierungsmedium suspendiert, um die Reaktion zu stoppen, und bei 300g über 3 Minuten zentrifugiert (Eppendorf 5810R), der Überstand wurde verworfen.

Das entstehende Zellpellet wurde resuspendiert mit 10 ml RPMI 1640-Medium; 3 ml Zellsuspension wurden für die weitere Kultivierung in Zellkulturflaschen überführt, der Rest für Transfektionsexperimente auf 24-Well Platten (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland) aufgebracht.

2.2.2 Transiente Transfektion

Zur Durchführung einer Transfektion existieren verschiedene Methoden, in dieser Studie wurde die Lipofektion zur transienten Transfektion verwendet. Hierbei werden die Plasmide mittels mit der Zielzellmembran fusionierender Lipidvesikel durch die Zellmembran der Zielzellen geschleust.

Die zu transfizierenden Zellen wurden wie vorbeschrieben mittels Trypsin gesplittet und mit PBS-Pufferlösung gewaschen. Vom resuspendierten Pellet wurden 500µl pro well ausgesät und nach einer Inkubation von 24h wie folgt transfiziert:

Pro well wurden 100µl PBS-Puffer in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß verbracht und mit den benötigten Plasmiden in variabler Menge - je nach Versuch und vorher erfolgter Konzentrationsbestimmung der Plasmide - versetzt (siehe Kapitel 3). Die DNA-Konzentration wurde durch Balancierung mit dem Leerplasmid pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) - jede Plasmidmischung wurde auf die gleiche DNA-Menge aufgefüllt (dies entspricht der Höchstmenge an verwandter DNA). Durch sachtetes Wenden wurde die Lösung vermischt. Hierzu wurde die benötigte Menge Fugene 6 oder Nanofectin eingebracht (nach Herstellerangaben) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 80µl der Lösung pro well vorsichtig aufpipettiert und die transfizierte Platte für 24 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

2.2.3 Dual-Luciferase-Assay

Der Dual-Luciferase-Assay bedient sich der Tatsache, daß es mehrere Luciferin/Luciferase-Systeme gibt, die nicht unter einander kompatibel sind und nur von der jeweils zugehörigen Luciferase umgesetzt werden. Zwei Luciferin/Luciferase-Systeme werden zum einen abhängig von einem zu überprüfenden Signal (in diesem Falle dem kanonischen Wnt-Signalweg) und zum andern unabhängig davon exprimiert. Die unabhängige Komponente wird als Vergleichswert für die Transfektionseffizienz herangezogen.

Durch die Bildung eines Quotienten von abhängiger zu unabhängiger Komponente gewinnt man einen Wert für das Signal, der Unterschiede in transfizierter Zellzahl wie Transfektionseffizienz korrigieren soll, da mehr transfizierte Zellen den Wert für das unabhängige Signal proportional zur transfizierten Zellzahl erhöhen.

Die Zellkulturplatten wurden von Medienüberstand befreit und mit 100 µl Lysepuffer pro well versetzt. Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurden die Zellysate aufgenommen und einzeln in Eppendorfgefäße verbracht, nach Herstellerangaben mit den Assay-Reagenzien behandelt und vermessen.

2.2.4 Isolation und Kultivierung von humanen Fettzellen

Kurzgefasst wurden Fettgewebeproben von 20-60 g Feuchtgewicht aus chirurgischen Mammareduktionsplastiken gewonnen und direkt in DMEM / Nutrient Mix F12 (DMEM/F12, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), ergänzt um 2% BSA, 100µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin, ins Labor transportiert.

Nach Entfernung von Bindegewebe und Blutgefäßen wurde das Fettgewebe zerkleinert und in Krebs Ringer Bikarbonatpuffer (KRB) mit 2%BSA Anteil mit 120 U/ml Kollagenase Typ 1 aus *Clostridium histolyticum* (Sigma) für 45-60 min bei 37° in einem Schüttel-Wasserbad verdaut.

Das verdaute Gewebe wurde anschließend durch Nylon-Gaze (250µm Porengröße) gefiltert und mit 0,1% BSA-haltigem KRB gewaschen. Zur Kultur wurden 2ml der isolierten schwimmenden Adipozyten in Kulturflaschen transferiert (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland), die 5 ml Zellkulturmedium enthielten (DMEM/F12 mit 15 mmol/l HEPES, 2,5mmol/l L-Glutamin, ergänzt um 1,125g/l NaHCO₃, 100 U/l Penicillin und 100µg/ml Streptomycin).

2.2.5 Präparation von FCCM

Die isolierten Fettzellen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5%CO₂ / 95% Luft aufbewahrt und 24 h kultiviert. Das konditionierte Medium wurde anschließend gesammelt, wobei darauf geachtet wurde, die obenauf schwimmenden Fettzellen zu aus dem geernteten Medium fernzuhalten, und bei -20°C gefroren aufbewahrt, bis es benutzt wurde. DMEM/F12 Medium, das ohne Fettzellen inkubiert wurde, wurde als Kontrollmedium für die Behandlung von INS-1 Zellen benutzt.

Die Glukosekonzentration im Kontrollmedium wurde wie die im FCCM vor der Behandlung der INS-1 auf 11mmol/l eingestellt.

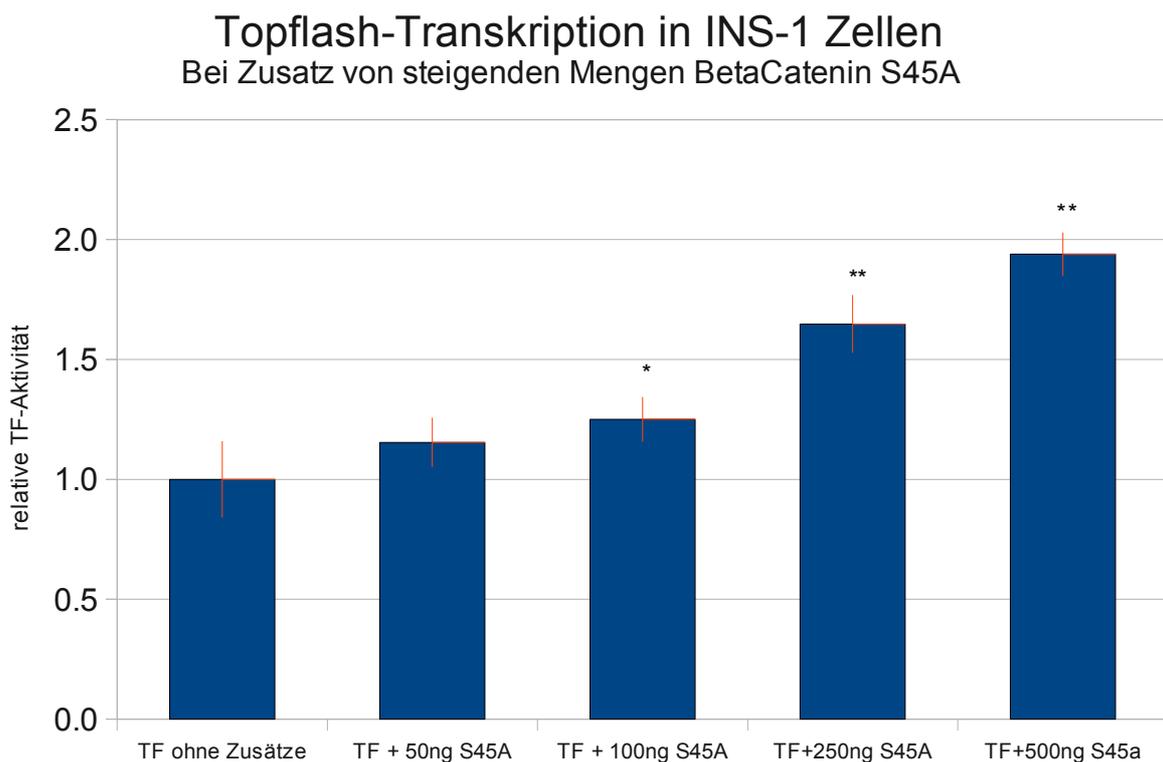
2.2.6 Statistik

Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und dreifach wiederholt. Alle statistischen Analysen erfolgten mittels Excel Software (Microsoft, Redmond, WA) und Open Office (www.openoffice.org).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Optimierung der transienten Transfektion

Zunächst wurde getestet, ob der Kanonische Wnt-Signalweg in INS-1 Zellen aktiv ist, um die Eignung des Modells zu prüfen. Hierzu wurden INS-1 Zellen mit steigenden Mengen β -Catenin S45A (einer konstitutiv aktiven Mutante und damit eines permanenten Aktivators des kanonischen Wnt-Signalwegs) und dem Transfektionseffizienzmarker pRLTK balanciert transient cotransfiziert. Zur Balancierung fand - wie bei allen Folgeversuchen - das Leerplasmid pcDNA3 Verwendung. In den Versuchen wurde neben einer Kontrollgruppe (im Folgenden CTRL) die konstitutiv aktive Mutante β -Catenin S45A in den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500ng eingesetzt.



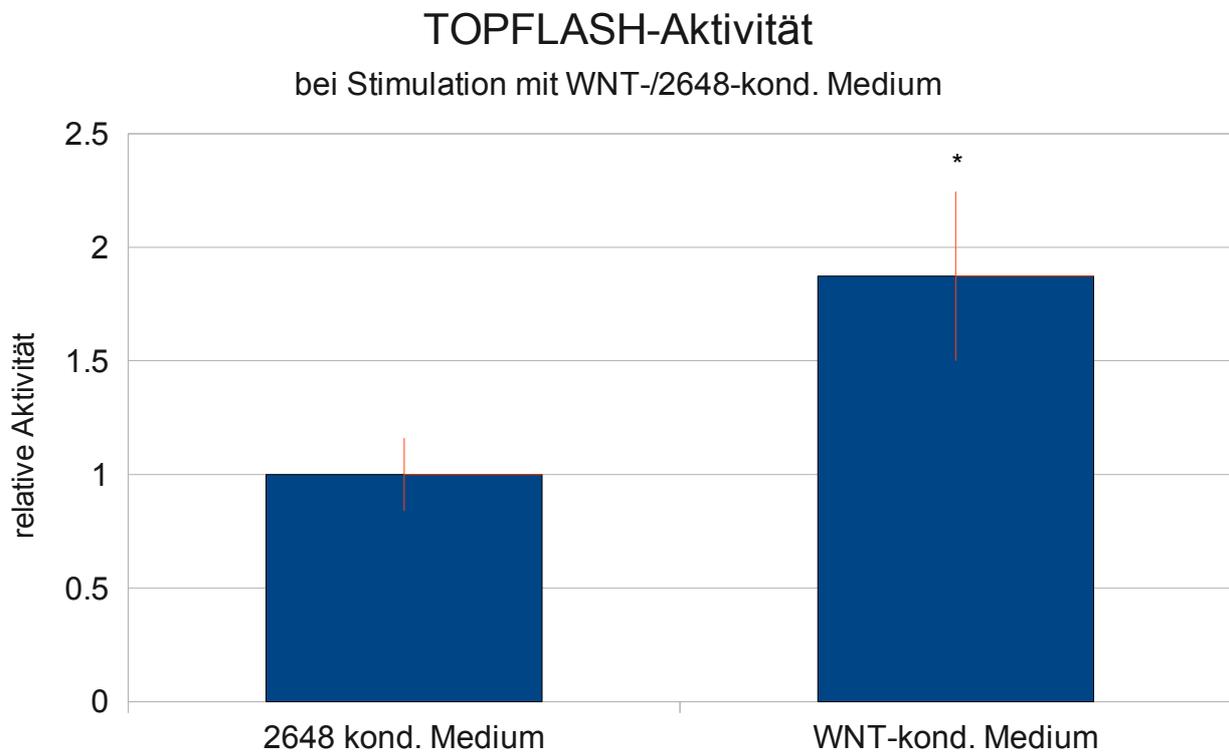
Mit (*) gekennzeichnete Werte sind signifikant von der Kontrollgruppe (TF ohne Zusätze) verschieden ($p < 0,05$), mit (**) gekennzeichnete Werte sind hoch signifikant verschieden ($p < 0,005$)

Die relative TOPFLASH-Aktivität wurde über Cotransfektion mit pRLTK errechnet, und dann normiert auf die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reporter genen balanciert transfiziert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Es fand sich bei steigenden Konzentrationen von β -Catenin ein signifikanter Anstieg der TF-Aktivität bei Zugabe von β -Catenin S45A bei Konzentrationen von 100ng, 250ng und 500ng (125%, 165% und 194% der Kontrollaktivität; $p=0,036519$, $p=0,000112$ und $p=0,000002$).

Es zeigte sich, daß mit einer höheren Dosis β -Catenin ein nahezu linearer Anstieg in der TF-Aktivität einhergeht.

3.2 Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs in INS-1 Zellen



Mit (*) gekennzeichnete Werte sind signifikant von der Kontrollgruppe (TF mit Kontrollmedium) hoch signifikant verschieden ($p < 0,005$).

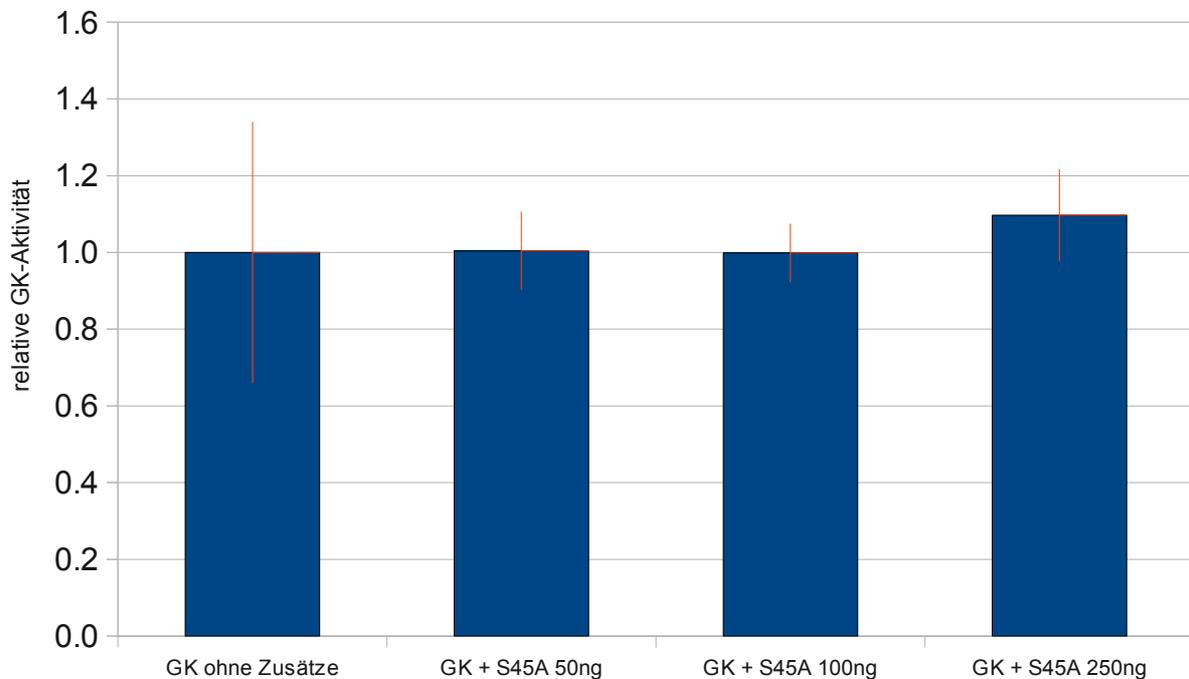
Die Ergebnisse wurden überprüft, indem mit TOPFLASH und pRLTK cotransfizierte Zellen für 24 h mit Wnt-konditioniertem Medium stimuliert wurden. Als Kontrolle diente CRL-2648-konditioniertes Medium.

Die relative TOPFLASH-Aktivität wurde über Cotransfektion mit pRLTK errechnet, und dann normiert auf die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reportergenen balanciert transfiziert und mit Kontrollmedium stimuliert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Es zeigte sich bei Stimulation mit Wnt3A-konditioniertem Medium ein hoch signifikant unterschiedlicher Anstieg der TOPFLASH-Aktivität (187% der Ausgangsaktivität, $p=0,000050$).

3.3 Untersuchung der Regulation der GK-Expression durch den kanonischen Wnt-Signalweg

Relative GK-Transkription
in Abhängigkeit von β -Catenin S45A



Keiner der Werte ist signifikant von der Kontrollgruppe (GK ohne Zusätze) verschieden ($p > 0,05$)

INS-1 Zellen wurden mit dem GK-Reporter gen und steigenden Mengen β -Catenin S45A und dem Transfektionseffizienzmarker pRLTK balanciert transient cotransfiziert. In den Versuchen wurde neben einer Kontrollgruppe (im Folgenden CTRL) die konstitutiv aktive Mutante β -Catenin S45A in den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500ng eingesetzt.

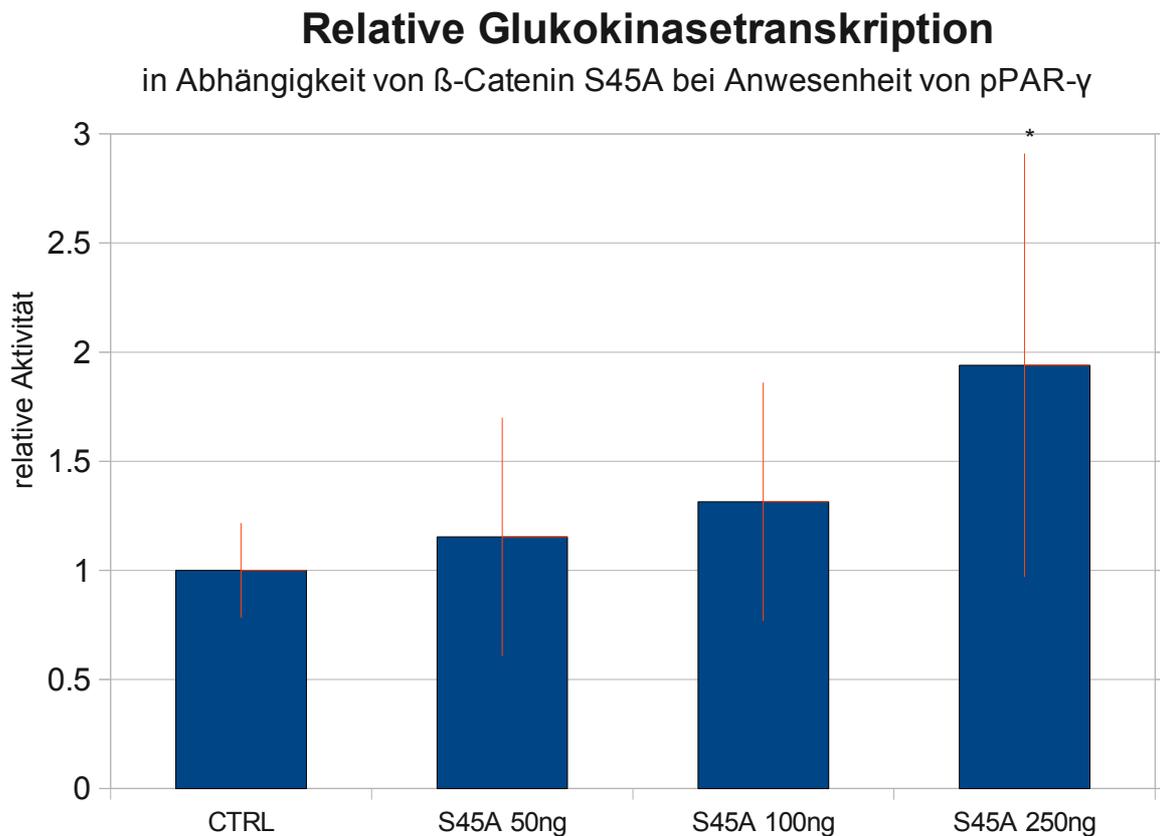
Die relative Transkription des GK-Promotors (im folgenden als GK-Aktivität bezeichnet) wurde über Cotransfektion mit pRLTK errechnet, und dann normiert auf

die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reporter genen balanciert transfiziert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Es fand sich bei steigenden Konzentrationen von β -Catenin kein signifikanter Anstieg der GK-Aktivität bei Zugabe von β -Catenin S45A (von einer Grundaktivität von 100% stieg die messbare Aktivität auf 100,44% ($p=0,846094$)), was auch bei 100 und 250 ng β -Cateninzusatz gleich blieb (99,87% bzw. 109,68% der Basisaktivität, $p=0,826242$ / $p=0,800981$).

Es zeigte sich, daß mit einer höheren Dosis β -Catenin nahezu kein Anstieg in der GK-Aktivität einhergeht.

3.4 Einfluss von β -Catenin und pPAR γ auf die GK-Expression



Mit (*) gekennzeichnete Werte sind signifikant von der Kontrollgruppe (GK ohne Zusätze) verschieden ($p < 0,05$)

INS-1 Zellen wurden nun mit dem GK-Reportergen und steigenden Mengen β -Catenin S45A und dem Transfektionseffizienzmarker pRLTK balanciert transient cotransfiziert. In den Versuchen wurde erneut neben einer Kontrollgruppe (im Folgenden CTRL) die konstitutiv aktive Mutante β -Catenin S45A in den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500ng eingesetzt, diesmal jedoch wurden alle Gruppen zusätzlich mit 50ng pPAR- γ cotransfiziert.

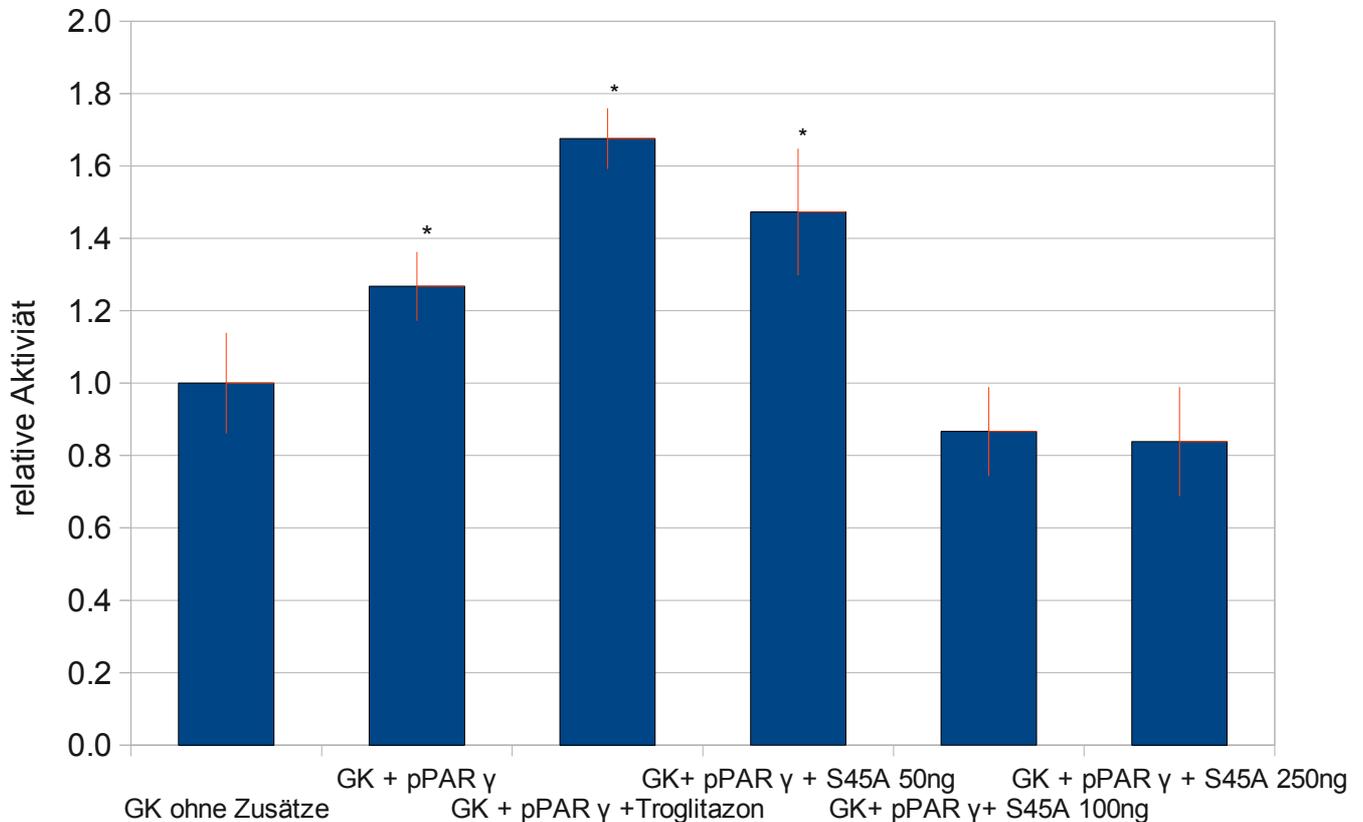
Die relative Transkription des GK-Promotors wurde über Cotransfektion mit pRLTK errechnet, und dann normiert auf die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reportergenen balanciert transfiziert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Die relative Transkription des GK-Promotors stieg nahezu linear mit der Menge des eingesetzten β -Catenins S45A an, bei 250 ng β -Catenin S45A in Anwesenheit von pPAR- γ unterschied sich das Ergebnis signifikant von der Kontrollgruppe (194% der Aktivität, $p=0,01998$). Die Ergebnisse für 50ng und 100ng β -Catenin S45A unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,46392$ und $p=0,08175$, respektive) von der Kontrollgruppe.

3.5 Einfluss von Troglitazon auf die GK-Expression

Glukokinasetranskription

Bei Zusatz von pPAR- γ , Troglitazon und zusätzlich β -Catenin S45A



Mit (*) gekennzeichnete Werte sind signifikant von der Kontrollgruppe (GK ohne Zusätze) verschieden ($p < 0,05$)

INS-1 Zellen wurden transient transfiziert mit GK und dem Transfektionseffizienzmarker pRTLK. In den Versuchen wurde neben einer Kontrollgruppe pPAR γ , sowie der pPAR- γ -Agonist Troglitazon in festen Konzentrationen verwandt, β -Catenin S45A in aufsteigender Konzentration (50,100,250 ng).

Die relative GK-Aktivität wurde über Cotransfektion mit pRTLK errechnet, und dann normiert auf die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reportergenen balanciert transfiziert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen

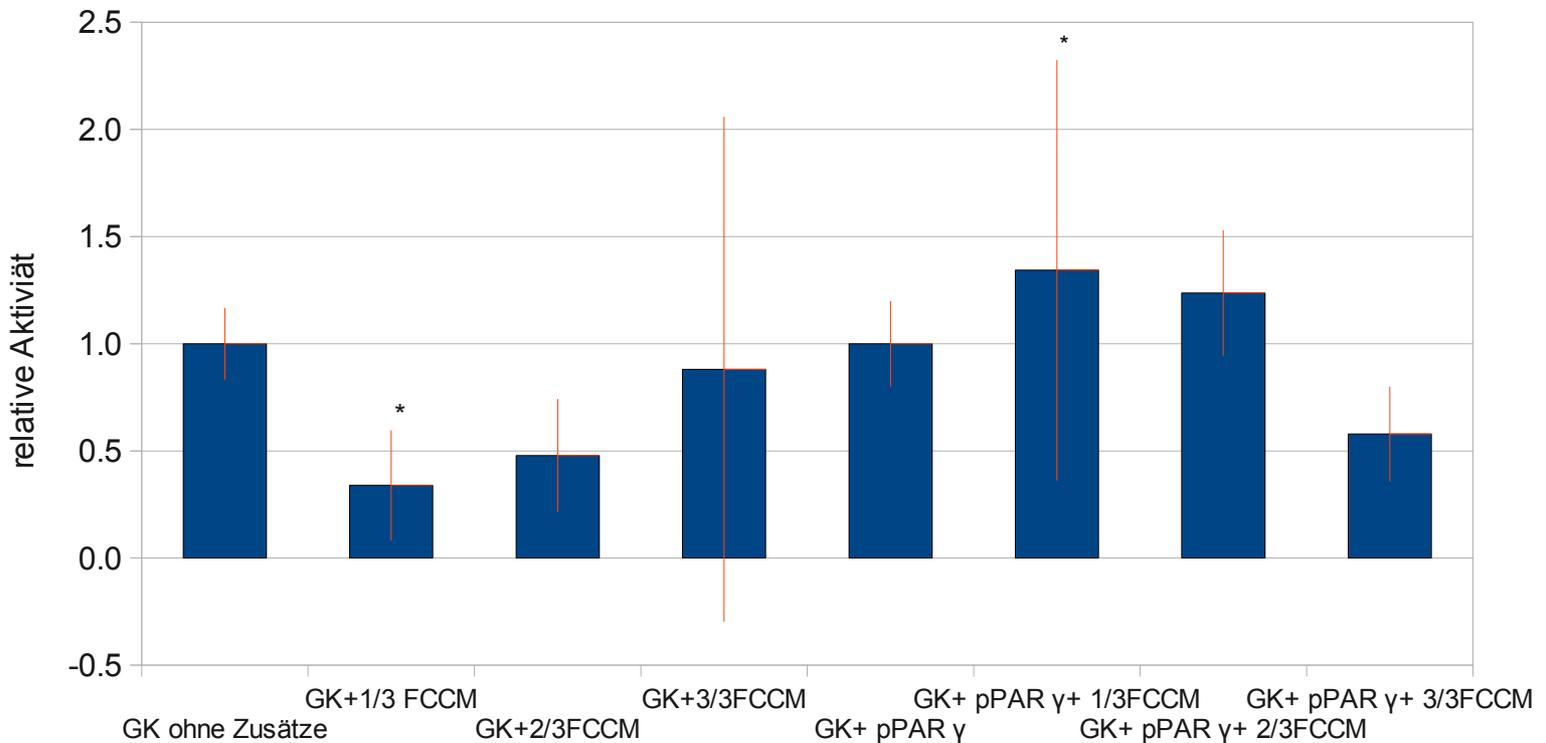
wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Es zeigte sich, daß die Aktivität im Vergleich zur Basisaktivität bei Zugabe von pPAR γ auf 127% anstieg ($p=0,0079$), bei zusätzlicher Beigabe von Troglitazon einen Maximalwert von 167,6% erreichte ($p=0,00365$) und auch durch zusätzliche steigende Mengen von β -Catenin S45A zu Troglitazon und pPAR γ nicht weiter stimulierbar war (147,2; 86,6 beziehungsweise 83,85% der Basisaktivität – $p=0,049775$; $0,061771$ bzw. $0,05638$).

3.6 Untersuchung der Wirkung von FCCM auf die GK-Expression

Glukokinasetranskription

Bei Zusatz von FCCM +/- pPAR- γ



Mit (*) gekennzeichnete Werte sind signifikant von der Kontrollgruppe (GK ohne Zusatz von FCCM, jeweils +/- pPAR γ) verschieden ($p < 0,05$)

INS-1 Zellen wurden transient transfiziert mit GK und dem Transfektionseffizienzmarker pRTLK. In den Versuchen wurde neben den Kontrollgruppen, die mit dem Standardmedium weiterbehandelt wurden, mit FCCM in aufsteigender Konzentration (1/3, 2/3 sowie unverdünntes FCCM, jeweils aufgefüllt mit RPMI1640-Medium) stimuliert über 24 h, beginnend 24 h nach Transfektion. Die gleiche Transfektionsreihe wurde einmal mit cotransfiziertem pPAR γ sowie einmal ohne pPAR γ durchgeführt.

Die relative GK-Aktivität wurde über Cotransfektion mit pRLTK errechnet, und dann normiert auf die Aktivität von INS-1 Zellen der respektiven Kontrollgruppe, die nur mit den Reportergenen (+ in einer Serie pPAR γ) balanciert transfiziert wurden (= 100 %). Alle Transfektionen wurden in drei Serien jeweils dreifach parallel gemäß Protokoll des Herstellers der Transfektionsreagenzien durchgeführt und als balancierte Transfektion ausgeführt.

Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der relativen Transkription des GK-Promotors unter Stimulation mit FCCM in 1/3 – Verdünnung (34% der Ausgangsaktivität, $p=0,008149$). Die mit pPAR γ cotransfizierte Reihe zeigt hingegen bei Stimulation mit 1/3 –Medium einen signifikanten Anstieg auf 134% der Ausgangsaktivität ($p=0,048923$).

Die weiteren Versuche zeigten keinen signifikanten Ergebnisse.

4 Diskussion

Schon seit der Antike ist das Krankheitsbild des Diabetes mellitus (von griechisch διαβήτης und lateinisch *mellitus* – in etwa “honigsüßer Durchfluss”) bekannt - aus vielen Hochkulturen, aus denen medizinische Schriften überdauert haben, so z.B. aus Indien (Dwivedi, Dwivedi 2007 – Sushruta) und Persien (hier die Schriften Avicennas).

Auch wenn die Einschätzung von Aretaios von Kappadozien, das Leben mit Diabetes sei „kurz, unangenehm und schmerzvoll“ (Medvei 1993 – The History of Clinical Endocrinology) dank moderner Behandlungsmethoden nicht mehr zu 100 Prozent Bestand hat, hat der Diabetes auf Grund seiner hohen Verbreitung in der Bevölkerung nichts an Bedeutung für die Medizin verloren - nach Schätzungen der WHO litten im Jahr 2000 knapp 2,8% der gesamten Weltbevölkerung an Diabetes (Wild, Roglic et al. 2004 – Global prevalence of diabetes).

Die akuten Komplikationen des Diabetes stehen für Patienten in entwickelten Ländern mittlerweile nicht mehr im Vordergrund - schon eher die nicht unerheblichen Folgeerkrankungen. Häufig sind hier vor allem die arterielle Hypertonie (75,2% der untersuchten Diabetiker), die diabetische Retinopathie, Neuropathie sowie die pAVK (mit rund 12, 11 und 7%) und die hieraus resultierenden Folgeschäden (Deutsche Diabetes Union 2007 – Gesundheitsbericht Diabetes 2007).

Insulinresistenz, Diabetes – insbesondere Typ II, Adipositas und das metabolische Syndrom zeigten in den letzten Jahren und Jahrzehnten eine stark gestiegene Prävalenz. Bei Kindern und Jugendlichen beispielsweise ist im Vergleich zu den Referenzdaten von 1985-1999 die Prävalenz für Übergewicht um 50% gestiegen, der Anteil der unter Adipositas leidenden hat sich sogar verdoppelt.

(Robert Koch-Institut (RKI) 05.10.2006 – Epidemiologisches Bulletin Ausgabe 40/2006)

Der Anteil von Übergewicht und Adipositas steigt im Schnitt pro Jahr um mehr als 2 % (WHO 09.09.2005 – Faktenblatt EURO_13_05), in den nächsten Jahren ist laut Wild et. al. mit einem globalen Anstieg der Diabetesprävalenz um min 57% zu

rechnen – bei stagnierender Adipositasrate für die nächsten 30 Jahre. Für steigende Adipositasprävalenz ist mit einem höheren Anstieg zu rechnen (Wild, Roglic et al. 2004 – Global prevalence of diabetes).

Das Metabolische Syndrom - das gemeinsame Auftreten von Diabetes, Adipositas, ein hoher Cholesterinspiegel und Hypertonie - stellt unter anderem ein gesteigertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse dar. Die hieraus entstehenden Folgeschäden sorgen - in heutigen Zeiten mehr denn je mit besonderem Augenmerk auf ihre volkswirtschaftliche Bedeutung - für ein gesteigertes Interesse an Möglichkeiten zur Prävention.

Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Diabetesentstehung ist noch immer nicht vollständig erforscht - diese Vergesellschaftung jedoch ist seit dem Altertum bekannt (vgl. Dwivedi, Dwivedi 2007 – Sushruta).

Diskutiert wird eine durch Hemmung des Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) 1- und 2-Signalwegs zu einer Insulinresistenz führende Erhöhung der freien Fettsäuren und Triglyceride in z.B. Leber und Muskelgewebe wie auch unter anderem der Weg über Jun Kinase 1 (JNK1). (Solinas, Vilcu et al. 2007 – JNK1 in hematopoietically derived cells, Petersen, Dufour et al. 2005 – Decreased insulin-stimulated ATP synthesis)

Ein Ansatz zum Verständnis des Metabolischen Syndroms hat sich in den letzten Jahren herauskristallisiert: Seit der Entdeckung der Adipokine 1994 ist allerdings auch klar, daß Adipozyten nicht nur als Speicherort für Fette, sondern auch als endokrines Organ wirken.

In diesem Zusammenhang wurden Wnt-Signale erst kürzlich als von Adipozyten produzierte Signalstoffe beschrieben. (Rhodes 2005 – Type 2 diabetes-a matter)

Fujino et al. haben 2003 in PNAS gezeigt, daß der kanonische Wnt-Signalweg für einen normal funktionierenden Cholesterin- und Glukosestoffwechsel notwendig ist - LRP-5 knockout-Mäuse zeigten phänotypisch eine stark eingeschränkte Glucosetoleranz sowie hohe Cholesterinspiegel (Fujino, Asaba et al. 2003 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) - ähnlich dem menschlichen Metabolischen Syndrom.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Adipozyten über Wnt-signale in der Betazelle angreifen und direkt die Transkription von Glukokinase beeinflussen. Im weiteren konnte gezeigt werden, daß diese Signalkette nicht nur direkt über Teile des kanonischen wnt-Signalwegs in vitro aktivierbar ist, sondern auch, daß Fettzell-konditioniertes Medium – das ebenfalls den Wnt-Signalweg aktiviert (Schinner, Willenberg et al. 2007 – Adipocyte-derived products induce the transcription) - ebenfalls zu einer erhöhten Glukokinasetranskription führt.

Glukokinase ist der Glukosesensor in den Betazellen des Pankreas (Matschinsky 1990 – Glucokinase as glucose sensor), und damit ein Schlüsselenzym für die Insulinausschüttung. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Adipozyten über ihre endokrine Funktion unter anderem vermittelt dem hier untersuchten und als adipocyte-derived factor bekannten Wnt3a (Schinner, Willenberg et al. 2007 – Adipocyte-derived products induce the transcription) direkt für die einer Insulinresistenz folgende Hyperinsulinämie verantwortlich sein könnten.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Zellen der INS-1 – Zelllinie benutzt. Es handelt sich bei den INS-1 Zellen um partiell Glukose-sensitive Insulinomazellen, die von Prof. Seissler (Universität München) zur Verfügung gestellt wurden.

Bei INS-1 Zellen handelt es sich um eine Ratten-Insulinom-Zelllinie mit teilweise erhaltener Glukosesensitivität, deren Funktion und Morphologie, insbesondere in Bezug auf die Insulinsekretion, sehr stark den der nativen Betazellen ähnelt (Asfari, Janjic et al. 1992 – Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting).

Verschiedenen Arbeitsgruppen haben umfangreiche Untersuchungen zur Wirkung von metabolischen und hormonellen Faktoren sowie Studien zur Genexpression betazellspezifischer Proteine mit INS-1 - Zellen durchgeführt (Asfari, Janjic et al. 1992 – Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting; Brun, Roche et al. 1993 – Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene; Susini, Roche et al. 1998 – Glucose and glucoincretin peptides synergize).

Zunächst wurde gezeigt, daß sich das verwendete System für die folgenden Untersuchungen als Modell der β -Zelle eignet, indem die Funktion des kanonischen Wnt-Signalwegs demonstriert wurde.

Die Zellen wurden parallel mit TOPFLASH und dem Transfektionseffizienzmarker pRLTK transfiziert. Die Transfektionen erfolgten balanciert.

Das TOPFLASH-Plasmid ist ein TCF-Luziferase-Reporterplasmid. Es enthält zwei Sets von drei Kopien der TCF-Bindungsstelle stromaufwärts des Thymidinkinase Minimalpromotors und dient als Modell für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs.

Es zeigt sich eine quasi linear von der β -Catenin S45A abhängige Zunahme der TOPFLASH-Aktivität.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist in der verwendeten Zelllinie intakt und aktiv, was sich aus dem nahezu linearen Zuwachs an TOPFLASH-Aktivität bei Kotransfektion von β -Catenin S45A ergibt. Hierbei handelt es sich um einen konstitutiv aktive Mutante des im kanonischen Wnt-Signalweg vorkommenden β -Catenins, die nicht phosphoryliert und über Ubiquitylierung abgebaut wird.

Über die nahezu lineare Zunahme der TOPFLASH-Aktivität unter β -Catenin lässt sich schließen, daß der kanonische Wnt-Signalweg in INS-1-Zellen aktiv ist und sich durch β -Catenin modellhaft aktivieren lässt - und hiermit, daß das verwendete Modell in diesem Bezug einer β -Zelle entspricht - im Gegensatz zu den Glukagonproduzierenden α -Zellen, in denen der kanonische wnt-Signalweg nicht aktivierbar ist (Yi, Brubaker et al. 2004 - TCF-4 Mediates Cell Type-specific Regulation of Proglucagon Gene Expression by β -Catenin and Glycogen Synthase Kinase-3 β)

Ebenso wurden die Zellen zunächst mit einem Glukokinase-Reportergen (pRGP 1003) und pRLTK sowie β -Catenin S45A kotransfiziert, ohne daß sich hier jedoch ein signifikanter Anstieg der Glukoninaseaktivität nachweisen ließ.

Kim et al. haben nachgewiesen, daß sich im Promotor des Glukokinasegens ein peroxisomal proliferator response element (PPRE) befindet, ohne den sich

Glukokinase nicht über pPAR- γ aktivieren lässt (Kim, Cha et al. 2002 – Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase).

Dass Wnt-Signale die Insulinsekretion regulieren, ist seit einiger Zeit bekannt; die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen jedoch sind noch nicht zur Gänze verstanden. Fujino et al. fanden einen deutlichen Rückgang in der Expression von Genen, die das Glucose-Sensing in Pankreatischen Betazellen bei LRP5-Knockout-Mäusen regulieren (Fujino, Asaba et al. 2003 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 5). Um den möglichen Rückschluss, daß Wnt-Signale direkt in das Glukosesensing eingreifen, zu prüfen, wurde die Zelllinie nun mit einer konstanten Menge pPAR- γ und steigenden Mengen β -Catenin S45a kotransfiziert. Detektiert wurde erneut die Aktivität des Glukokinase-Reporters pRGP 1003. Die Transfektionen erfolgten balanciert. Die eingesetzte pPAR- γ -Menge war in den Versuchen gleich, die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs wurde über die eingesetzte Menge β -Catenin variiert. Die Transfektionseffizienz wurde wiederum durch pRLTK kontrolliert, wobei sich die Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant veränderte (194% der Aktivität, $p=0,01998$).

Dieses Ergebniss legt nahe, daß pPAR- γ durch β -Catenin koaktiviert wird.

Um zu prüfen, ob die maximale Aktivierung von pPAR- γ einen Einfluss auf das getestete System hat, wurde Troglitazon, ein Thiazolidinedion eingesetzt.

Thiazolidinedione sind direkte Liganden von pPAR- γ . Hierzu wurde die obige Transfektion wiederholt, jedoch wurde eine Kontrollgruppe ohne Troglitazon, eine Kontrollgruppe mit pPAR- γ und Troglitazon sowie drei Gruppen mit pPAR- γ , Troglitazon und steigenden Mengen β -Catenin S45A erstellt. Die Transfektionen erfolgten ebenfalls balanciert.

Thiazolidinedione wie Rosiglitazon oder (das klinisch nicht zugelassene) Troglitazon werden klinisch bei Typ II-Diabetes eingesetzt, da sie mit hoher Affinität an pPAR- γ binden, (60th Annual Scientific Session of the American Diabetes Association (ADA); Symposium "Insights and Updates on Thiazolidindiones: Current Information for Managing Patients with Type 2 Diabetes". 10. Juni 2000, San Antonio) und dieses aktivieren.

Wie zu erwarten erreicht die GK-Aktivität bei Anwesenheit von pPAR- γ einen signifikant erhöhten Wert von 127% der Ausgangsaktivität ($p=0,0079$), bei kombinierter Stimulation mit pPAR- γ und Troglitazon sogar eine maximale Aktivität von 167,6% des Ausgangswertes ($p=0,00365$).

Die zusätzliche Kotransfektion von β -Catenin S45A führte in dieser Konstellation zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung.

Ein Schritt weiter entfernt von der reinen in-vitro Signalkette hin zu einem weiter dem Zielorganismus angenäherten System ist die Verwendung von durch menschliche Adipozyten konditioniertem Medium (FCCM), daß, wie oben beschrieben, wnt-Signale beinhaltet.

Um zu testen, ob die hier in vitro nachgewiesene Signalkette auch durch Fettzellkonditioniertes Medium aktiviert wird, wurde dieses in Transfektionsversuchen anstelle von β -Catenin S45A eingesetzt, die Transfektionseffizienz wurde erneut mittels pRLTK bestimmt. Die Transfektionen erfolgten balanciert. INS-1-Zellen wurden mit GK, pRLTK und pPAR- γ kotransfiziert, 24h inkubiert und danach mit FCCM in ansteigenden Konzentrationen stimuliert. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Zellen nur mit RPMI1640-Medium stimuliert.

Wenn die Fettzellen über den kanonischen Wnt-Pathway Glukokinase beeinflussen, müsste sich ein Anstieg der Glukokinasetranskription unter der Behandlung mit FCCM zeigen, der signifikant höher ausfallen sollte, wenn pPAR- γ dem System hinzugefügt wird. PPAR- γ wird in primären Inseln (alpha- und betazellen) stark exprimiert (Braissant, Fougère et al. 1996 – Differential expression of peroxisome proliferator-activated).

Die Ergebnisse der Transfektionen und folgenden Stimulationen mit FCCM in aufsteigender Konzentration (Verdünnung auf 1/3, 2/3 und unverdünnt vs Kontrollmedium) zeigen ohne Zusatz von pPAR- γ ein signifikantes Absinken der Glukokinase-Aktivität bei Zusatz von 1/3 verdünntem FCCM, bei ansteigenden Konzentrationen zeigt sich keine signifikante Veränderung der Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Kotransfektion von pPAR- γ und Stimulation mit FCCM in aufsteigender Konzentration zeigt sich ein signifikanter Anstieg für 1/3 verdünntes

FCCM; Steigerung der Konzentration führt nicht zu einem wesentlichen Anstieg oder Absinken der Aktivität.

Ohne pPAR- γ , dessen response-Element, wie in (Kim, Cha et al. 2002 – Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase) gezeigt, im Promotor des Glukokinase-Gens vorhanden ist, sinkt die Glukokinaseaktivität bei Stimulation mit FCCM, ist es durch Kotransfektion vorhanden, sieht man eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der GK-Aktivität.

Wie zu erwarten, beobachtet man bei Verwendung von FCCM anstelle von transfiziertem β -Catenin S45A oder Wnt3a weitere Effekte, vorwiegend GK-Aktivität dämpfender Natur, da FCCM neben den Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs auch andere Substanzen und Signalstoffe enthält – ebenso wie andere Stoffwechselprodukte der Fettzellen, was sich aus dem (als Trend erkennbaren) Absinken der GK-Aktivität trotz Anwesenheit von pPAR- γ bei Verwendung von unverdünntem Fettzellkonditioniertem Medium schließen lässt. Auf eine weitergehende Untersuchung dieser Effekte wurde verzichtet, da diese den Rahmen dieser Arbeit weit überschreiten würde.

Der deutliche Sprung in der Aktivität zwischen pPAR- γ -positiven Experimentgruppen und der Negativkontrolle zeigt, daß der Wnt-Signalweg sich hier mit pPAR- γ überschneidet, das in vivo ebenfalls aktiv ist.

Bei verdünntem Medium in Kombination mit pPAR- γ zeigt sich eine deutliche Steigerung der GK-Aktivität – wie auch unter der Behandlung mit Glitazonen führt die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer gesteigerten Glukokinaseexpression.

Wie 2005 von Jansson et al. beschrieben, existieren in vivo auch Querverbindungen zwischen dem kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg und der Expression von pPAR- γ , die zu einer gesteigerten Expression von pPAR- γ und damit zu einer positiven Rückkopplung für die Glukokinaseexpression führen. (Jansson, Are et al. 2005 – The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets)

Von Schinner et al. (Schinner, Ulgen et al. 2008 – Regulation of insulin secretion) für INS-1-Zellen, ebenso wie von Joesting et al. für andere Zelllinien (Joesting, Perrin et al. 2005 – Identification of SFRP1) wurde gezeigt, daß sich die Effekte von Wnt3A und FCCM auf diverse Reportersysteme (TOPFLASH, Cyclin-D1, Glukokinase) mittels sFRP1 - einem selektiven Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs – hemmen lassen.

In dieser Studie wurde gezeigt, daß der Glukokinase-Genpromotor ein direktes Ziel für den Wnt-Signalweg in Betazellen darstellt. Es wurde eine funktionelle Interaktion zwischen β -catenin und PPAR γ in insulinproduzierenden Zellen demonstriert. Die obigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, daß aktiviertes β -Catenin die PPAR γ -vermittelte Transkription am Glukokinasepromotor koaktiviert.

Zusammengenommen definiert dies das Glukokinase-Gen als neues Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs, dessen weitere Erforschung, insbesondere im Hinblick auf resultierende mögliche neue Therapieansätze des Diabetes mellitus, durchaus wünschenswert erscheint.

„The doctor of the future will give no medicine, but will instruct his patient in the care of the human frame, in diet and in the cause and prevention of disease.“

Thomas Alva Edison
1847-1931

5 Zusammenfassung

Andreas Johannes Wölk

Glukokinase als ein neues Zielgen des kanonischen Wnt-3-Signalwegs in Insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas

Der Pathomechanismus, der zu einer Insulinresistenz und zur Hyperinsulinämie beim Typ 2 – Diabetiker führt, ist immer noch unbekannt. Vor kurzem wurden Wnts als von Wnt-Signalmoleküle wurden vor kurzem als neue Adipozyten entstammende Faktoren identifiziert. Sie regulieren ebenfalls die Insulinsekretion und den Zellzyklus in Betazellen. Das Ziel dieser Studie war, den Effekt von Adipozyten entstammenden Wnt-Signalmolekülen auf die Glukokinasetranskription in Beta-Zellen des Pankreas zu untersuchen.

Mittels transienter Transfektion wurde an einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) die Effekte des kanonischen Wnt-Signalwegs untersucht.

Menschliche Fettzellen wurden isoliert, um Fettzellstimuliertes Medium (FCCM) zu erzeugen. Die partiell glukosesensitiven INS-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 7 mM, Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert, und mit folgenden Plasmiden und Zusätzen transfiziert/stimuliert: pRLTK, TOPFLASH(TF), β -CateninS45A, pRGP1003(GK), pPAR- γ (50ng), Troglitazon 10 μ mol, FCCM in 1/3 und 2/3-Verdünnung sowie unverdünnt.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist in INS-1 Zellen intakt und aktiv. Die Kotransfektion von GK und β -Catenin S45A führt nur zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität von Glukokinase, wenn gleichzeitig pPAR- γ anwesend ist. Troglitazon stimuliert die Aktivität von GK unter diesen Bedingungen maximal, eine weitere Steigerung der β -Cateninmenge führt zu keiner signifikanten Steigerung der Aktivität. Die Stimulation von mit GK transfizierten INS-1-Zellen mit FCCM führt in Anwesenheit von pPAR- γ zu einem signifikanten Anstieg auf 134% der Ausgangsaktivität ($p=0,048923$), ohne pPAR- γ führt FCCM zu einem Abfall der GK-Aktivität auf 34% der Ausgangsaktivität ($p=0,008149$).

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, daß Glukokinase ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in β -Zellen ist. β -Catenin fungiert in insulinproduzierenden Zellen als Aktivator für die Transkription des Glukokinasegens. Dies könnte möglicherweise ein weiterer Schritt zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sein.

This page intentionally left blank.

6 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Andreas Johannes Wölk
Geboren: 28.12.1980 in Herford
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Dr. Gerhard J. Wölk (Frauenarzt)
Lucia Wölk, geb. Thöle (Dipl. Pädagogin)

Schulbildung

1987-1991 Brenchenschule Witten (Grundschule)
1991-2000 Ruhr-Gymnasium Witten
2000 Abitur

Wehrdienst

2000-2001 Sanitätssoldat (Schule für Nachrichtenwesen der Bundeswehr, Bad Ems)

Studium

2001-2006 Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2003 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2006-2007 Praktisches Jahr Klinikum Leverkusen (AKL der Universität Köln)
08/2006-12/2006 1. Tertial – Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin
12/2006-03/2007 2. Tertial – Onkologie/Hämatologie/Gastroenterologie
03/2007-07/2007 3. Tertial – Unfallchirurgie/Gefäßchirurgie/Allgemeinchirurgie
11/2007 Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen nach ÄAppO 2002)

Berufliche Tätigkeit

03/08-01/09 Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik Maria-Hilf-Krankenhaus
Bergheim
seit 02/09 Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik Marien Hospital
Euskirchen

7 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

Amit, S; Hatzubai, A; Birman, Y; Andersen, J S; Ben-Shushan, E; Mann, M et al.: *Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. In: Genes & development* (2002), Jg. 16, H. 9, S. 1066–1076.

Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.230302.

Asfari, M; Janjic, D; Meda, P; Li, G; Halban, P A; Wollheim, C B: *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. In: Endocrinology* (1992), Jg. 130, H. 1, S. 167–178.

Barbuio, R; Milanski, M; Bertolo, M B; Saad, M J; Velloso, L A: *Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. In: The Journal of endocrinology* (2007), Jg. 194, H. 3, S. 539–550. Online verfügbar unter doi:10.1677/JOE-07-0234.

Barker, N; Hurlstone, A; Musisi, H; Miles, A; Bienz, M; Clevers, H: *The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. In: The EMBO journal* (2001), Jg. 20, H. 17, S. 4935–4943. Online verfügbar unter doi:10.1093/emboj/20.17.4935.

Barzilai, N; She, L; Liu, B Q; Vuguin, P; Cohen, P; Wang, J; Rossetti, L: *Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. In: Diabetes* (1999), Jg. 48, H. 1, S. 94–98.

Bell, G I; Cuesta-Munoz, A; Matschinsky, F M: *"Glucokinase"*. Encyclopedia of Molecular Medicine (2002): John Wiley and Sons Ltd.

Braissant, O; Foufelle, F; Scotto, C; Dauça, M; Wahli, W: *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. In: Endocrinology* (1996), Jg. 137, H. 1, S. 354–366.

Brun, T; Roche, E; Kim, K H; Prentki, M: *Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic beta-cell line (INS-1)*. In: *The Journal of biological chemistry* (1993), Jg. 268, H. 25, S. 18905–18911.

Butler, A E; Janson, J; Bonner-Weir, S; Ritzel, R; Rizza, R A; Butler, P C: *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. In: *Diabetes* (2003), Jg. 52, H. 1, S. 102–110.

Cha, J Y; Kim, H I; Im, S S; Li, T Z; Ahn, Y H: *HNF1 and/or HNF3 may contribute to the tissue specific expression of glucokinase gene*. In: *Experimental & molecular medicine* (2001), Jg. 33, H. 2, S. 59–63.

Christodoulides, C; Laudes, M; Cawthorn, W P; Schinner, S; Soos, M; O'Rahilly, S et al.: *The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis*. In: *Journal of cell science* (2006), Jg. 119, H. Pt 12, S. 2613–2620. Online verfügbar unter doi:10.1242/jcs.02975.

Cypess, A M; Lehman, S; Williams, G; Tal, I; Rodman, D; Goldfine, A B et al.: *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. In: *The New England journal of medicine* (2009), Jg. 360, H. 15, S. 1509–1517. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa0810780.

Deutsche Diabetes Union (2007): *Gesundheitsbericht Diabetes 2007*. Online verfügbar unter http://www.diabetesstiftung.de/fileadmin/dds_user/dokumente/DDU_Gesundheitsbericht_2007.pdf.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung; Deutschland.; Deutschland.: *Ernährungsbericht 2008* (2008). Bonn: Dt. Gesellsch. für Ernährung; Deutsche Ges. f. Ernährung.

Dietel, M; Suttorp, N; Zeitz, M: *Harrisons Innere Medizin*. Deutsche Ausgabe. In Zusammenarbeit mit der Charité. 16., Aufl. Berlin (2005): ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft.

Dreyer, C; Krey, G; Keller, H; Givel, F; Helftenbein, G; Wahli, W: *Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors*. In: *Cell* (1992), Jg. 68, H. 5, S. 879–887.

Dwivedi, G; Dwivedi, S: *Sushruta – the Clinician – Teacher par Excellence*. In: *Indian J Chest Dis Allied Sci* (2007), H. 49, S. 243–244. Online verfügbar unter <http://medind.nic.in/iae/t07/i4/iaet07i4p243.pdf>.

Ehrhart-Bornstein, M; Lamounier-Zepter, V; Schraven, A; Langenbach, J; Willenberg, H S; Barthel, A et al.: *Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2003), Jg. 100, H. 24, S. 14211–14216. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.2336140100.

Flores-Riveros, J R; McLenithan, J C; Ezaki, O; Lane, M D: *Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1993), Jg. 90, H. 2, S. 512–516.

Florez, J C; Jablonski, K A; Bayley, N; Pollin, T I; Bakker, P I W de; Shuldiner, A R et al.: *TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program*. In: *The New England journal of medicine* (2006), Jg. 355, H. 3, S. 241–250. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa062418.

Fox, C S; Hwang, S-J; Massaro, J M; Lieb, K; Vasan, R S; O'Donnell, C J; Hoffmann, U: *Relation of subcutaneous and visceral adipose tissue to coronary and abdominal aortic calcium (from the Framingham Heart Study)*. In: *The American journal of cardiology* (2009), Jg. 104, H. 4, S. 543–547. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.amjcard.2009.04.019.

Fujino, T; Asaba, H; Kang, M-J; Ikeda, Y; Sone, H; Takada, S et al.: *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2003), Jg. 100, H. 1, S. 229–234. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0133792100.

Gidh-Jain, M; Takeda, J; Xu, L Z; Lange, A J; Vionnet, N; Stoffel, M et al.: *Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1993), Jg. 90, H. 5, S. 1932–1936.

Grant, S F A; Thorleifsson, G; Reynisdottir, I; Benediktsson, R; Manolescu, A; Sainz, J et al.: *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. In: Nature genetics* (2006), Jg. 38, H. 3, S. 320–323. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng1732.

Hagen, T; Sethi, J K; Foxwell, N; Vidal-Puig, A: *Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments. In: The Biochemical journal* (2004), Jg. 379, H. Pt 2, S. 471–477. Online verfügbar unter doi:10.1042/BJ20031749.

Haslam, D W; James, W P T: *Obesity. In: Lancet* (2005), Jg. 366, H. 9492, S. 1197–1209. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(05)67483-1.

Heller, R S; Klein, T; Ling, Z; Heimberg, H; Kato, M; Madsen, O D; Serup, P: *Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas. In: Gene expression* (2003), Jg. 11, H. 3-4, S. 141–147.

Henquin, J C: *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. In: Diabetes* (2000), Jg. 49, H. 11, S. 1751–1760.

Herold, G: *Innere Medizin 2007. Eine vorlesungsorientierte Darstellung - mit ICD 10-Schlüssel* (2006): Herold.

Hotamisligil, G S: *Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. In: Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* (1999), Jg. 107, H. 2, S. 119–125.

Hotamisligil, G S; Peraldi, P; Budavari, A; Ellis, R; White, M F; Spiegelman, B M: *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. In: Science (New York, N.Y.)* (1996), Jg. 271, H. 5249, S. 665–668.

Hotamisligil, G S; Spiegelman, B M: *Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. In: Diabetes* (1994), Jg. 43, H. 11, S. 1271–1278.

Huelsken, J; Behrens, J: *The Wnt signalling pathway. In: Journal of cell science* (2002), Jg. 115, H. Pt 21, S. 3977–3978.

Ibrahim, M M: *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. In: Obesity reviews : an official journal of the International Association for*

the Study of Obesity (2009). Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.

Jansson, E A; Are, A; Greicius, G; Kuo, I-C; Kelly, D; Arulampalam, V; Pettersson, S: *The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005), Jg. 102, H. 5, S. 1460–1465. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0405928102.

Joesting, M S; Perrin, S; Elenbaas, B; Fawell, S E; Rubin, J S; Franco, O E et al.: *Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. In: Cancer research* (2005), Jg. 65, H. 22, S. 10423–10430. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0824.

Juhan-Vague, I; Alessi, M C: *Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis. In: Thrombosis and haemostasis* (1993), Jg. 70, H. 1, S. 138–143.

Kahn, B B; Flier, J S: *Obesity and insulin resistance. In: The Journal of clinical investigation* (2000), Jg. 106, H. 4, S. 473–481. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI10842.

Kim, H-i; Cha, J-Y; Kim, S-Y; Kim, J-w; Roh, K J; Seong, J-K et al.: *Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma upregulates glucokinase gene expression in beta-cells. In: Diabetes* (2002), Jg. 51, H. 3, S. 676–685.

Kim, S-Y; Kim, H-i; Park, S-K; Im, S-S; Li, T; Cheon, H G; Ahn, Y-h: *Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. In: Diabetes* (2004), Jg. 53 Suppl 1, S. S66-70.

Klöppel, G; Löhr, M; Habich, K; Oberholzer, M; Heitz, P U: *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. In: Survey and synthesis of pathology research* (1985), Jg. 4, H. 2, S. 110–125.

Koubova, J; Guarente, L: *How does calorie restriction work? In: Genes & development* (2003), Jg. 17, H. 3, S. 313–321. Online verfügbar unter doi:10.1101/gad.1052903.

- Kramps, T;** Peter, O; Brunner, E; Nellen, D; Froesch, B; Chatterjee, S et al.: *Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex.* In: *Cell* (2002), Jg. 109, H. 1, S. 47–60.
- Lee, D W;** Yu, B P: *Modulation of free radicals and superoxide dismutases by age and dietary restriction.* In: *Aging (Milan, Italy)* (1990), Jg. 2, H. 4, S. 357–362.
- Logan, C Y;** Nusse, R: *The Wnt signaling pathway in development and disease.* In: *Annual review of cell and developmental biology* (2004), Jg. 20, S. 781–810. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Longo, K A;** Kennell, J A; Ochocinska, M J; Ross, S E; Wright, W S; MacDougald, O A: *Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors.* In: *The Journal of biological chemistry* (2002), Jg. 277, H. 41, S. 38239–38244. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M206402200.
- Ludescher, B;** Machann, J; Eschweiler, G W; Vanhöfen, S; Maenz, C; Thamer, C et al.: *Correlation of Fat Distribution in Whole Body MRI With Generally Used Anthropometric Data.* In: *Investigative radiology* (2009). Online verfügbar unter doi:10.1097/RLI.0b013e3181afbb1e.
- MacDougald, O A;** Burant, C F: *The rapidly expanding family of adipokines.* In: *Cell metabolism* (2007), Jg. 6, H. 3, S. 159–161. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cmet.2007.08.010.
- Malbon, C C:** *Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors.* In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (2004), Jg. 9, S. 1048–1058.
- Matschinsky, F M:** *Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes.* In: *Diabetes* (1990), Jg. 39, H. 6, S. 647–652.
- Matschinsky, F M:** *Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.* In: *Diabetes* (1996), Jg. 45, H. 2, S. 223–241.
- McGarry, J D:** *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes.* In: *Diabetes* (2002), Jg. 51, H. 1, S. 7–18.

Medina-Gomez, G; Vidal-Puig, A: *Gateway to the metabolic syndrome*. In: *Nature medicine* (2005), Jg. 11, H. 6, S. 602–603. Online verfügbar unter doi:10.1038/nm0605-602.

Medvei, V C: *The History of Clinical Endocrinology. A Comprehensive Account of Endocrinology from Earliest Times to the Present Day* (1993): Informa Healthcare.

Mensink, G B M; Lampert, T; Bergmann, E: *[Overweight and obesity in Germany 1984-2003]*. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* (2005), Jg. 48, H. 12, S. 1348–1356. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00103-005-1163-x.

Monzillo, L U; Hamdy, O; Horton, E S; Ledbury, S; Mullooly, C; Jarema, C et al.: *Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance*. In: *Obesity research* (2003), Jg. 11, H. 9, S. 1048–1054. Online verfügbar unter doi:10.1038/oby.2003.144.

Nedergaard, J; Bengtsson, T; Cannon, B: *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* (2007), Jg. 293, H. 2, S. E444-52. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.

Papadopoulou, S; Edlund, H: *Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function*. In: *Diabetes* (2005), Jg. 54, H. 10, S. 2844–2851.

Petersen, K F; Dufour, S; Shulman, G I: *Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents*. In: *PLoS medicine* (2005), Jg. 2, H. 9, S. e233. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pmed.0020233.

Rhodes, C J: *Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?* In: *Science (New York, N.Y.)* (2005), Jg. 307, H. 5708, S. 380–384. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1104345.

Rizza, R A; Mandarino, L J; Genest, J; Baker, B A; Gerich, J E: *Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man*. In: *Diabetologia* (1985), Jg. 28, H. 2, S. 70–75.

Robert Koch-Institut (RKI) (2006): *Epidemiologisches Bulletin Ausgabe 40/2006*.

Online verfügbar unter

http://www.rki.de/cln_091/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/40__06,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/40_06.pdf, zuletzt aktualisiert am 05.10.2006, zuletzt geprüft am 12.07.2009.

Ross, S E; Hemati, N; Longo, K A; Bennett, C N; Lucas, P C; Erickson, R L; MacDougald, O A: *Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling*. In: *Science (New York, N.Y.)* (2000), Jg. 289, H. 5481, S. 950–953.

Savage, D B; Petersen, K F; Shulman, G I: *Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation*. In: *Hypertension* (2005), Jg. 45, H. 5, S. 828–833. Online verfügbar unter doi:10.1161/01.HYP.0000163475.04421.e4.

Schinner, S; Ulgen, F; Papewalis, C; Schott, M; Woelk, A; Vidal-Puig, A; Scherbaum, W A: *Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules*. In: *Diabetologia* (2008), Jg. 51, H. 1, S. 147–154. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00125-007-0848-0.

Schinner, S; Willenberg, H S; Krause, D; Schott, M; Lamounier-Zepter, V; Krug, A W et al.: *Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway*. In: *International journal of obesity (2005)* (2007), Jg. 31, H. 5, S. 864–870. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.ijo.0803508.

Schinner, S; Barthel, A; Dellas, C; Grzeskowiak, R; Sharma, S K; Oetjen, E et al.: *Protein kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on glucagon gene transcription*. In: *The Journal of biological chemistry* (2005), Jg. 280, H. 8, S. 7369–7376. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M408560200.

Schinner, S; Dellas, C; Schroder, M; Heinlein, C A; Chang, C; Fischer, J; Knepel, W: *Repression of glucagon gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through inhibition of Pax6 transcriptional activity*. In: *The Journal of biological chemistry* (2002), Jg. 277, H. 3, S. 1941–1948. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M109718200.

Seissler, J; Nguyen, T B; Aust, G; Steinbrenner, H; Scherbaum, W A: *Regulation of the diabetes-associated autoantigen IA-2 in INS-1 pancreatic beta-cells. In: Diabetes* (2000), Jg. 49, H. 7, S. 1137–1141.

Shao, J-S; Cheng, S-L; Pingsterhaus, J M; Charlton-Kachigian, N; Loewy, A P; Towler, D A: *Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. In: The Journal of clinical investigation* (2005), Jg. 115, H. 5, S. 1210–1220. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI24140.

Smith, B A; Edwards, M S; Ballachey, B E; Cramer, D A; Sutherland, T M: *Body weight and longevity in genetically obese and non-obese mice fed fat-modified diets. In: Growth, development, and aging : GDA* (1991), Jg. 55, H. 2, S. 81–89.

Sobotta, J; Welsch, U; Sobotta-Welsch: *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. 2., völlig überarb. Aufl., 1. Nachdr. München* (2006): Elsevier Urban & Fischer.

Solinas, G; Vilcu, C; Neels, J G; Bandyopadhyay, G K; Luo, J-L; Naugler, W et al.: *JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. In: Cell metabolism* (2007), Jg. 6, H. 5, S. 386–397. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cmet.2007.09.011.

Steneberg, P; Rubins, N; Bartoov-Shifman, R; Walker, M D; Edlund, H: *The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. In: Cell metabolism* (2005), Jg. 1, H. 4, S. 245–258. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cmet.2005.03.007.

Steppan, C M; Bailey, S T; Bhat, S; Brown, E J; Banerjee, R R; Wright, C M et al.: *The hormone resistin links obesity to diabetes. In: Nature* (2001), Jg. 409, H. 6818, S. 307–312. Online verfügbar unter doi:10.1038/35053000.

Stern, E; Strihan, C; Potievsky, O; Nimri, R; Shalitin, S; Cohen, O et al.: *Four novel mutations, including the first gross deletion in TCF1, identified in HNF-4alpha, GCK and TCF1 in patients with MODY in Israel. In: Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* (2007), Jg. 20, H. 8, S. 909–921.

Susini, S; Roche, E; Prentki, M; Schlegel, W: *Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in*

pancreatic beta(*INS-1*) cells. In: *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (1998), Jg. 12, H. 12, S. 1173–1182.

The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Online verfügbar unter http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf.

Tolwinski, N S; Wieschaus, E: *A nuclear function for armadillo/beta-catenin*. In: *PLoS biology* (2004), Jg. 2, H. 4, S. E95. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pbio.0020095.

Townsley, F M; Cliffe, A; Bienz, M: *Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function*. In: *Nature cell biology* (2004), Jg. 6, H. 7, S. 626–633. Online verfügbar unter doi:10.1038/ncb1141.

Unger, R H: *The physiology of cellular liporegulation*. In: *Annual review of physiology* (2003), Jg. 65, S. 333–347. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142622.

Weir, G C; Bonner-Weir, S: *Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes*. In: *Diabetes* (2004), Jg. 53 Suppl 3, S. S16-21.

Welsch, U: *Sobotta: Lehrbuch Histologie* (2005): Elsevier Urban & Fischer.

WHO (2005): *Faktenblatt EURO_13_05 - Adipositas: Eine Herausforderung für die Europäische Region der WHO*. Online verfügbar unter <http://www.euro.who.int/document/mediacentre/fs1305g.pdf>, zuletzt aktualisiert am 09.09.2005, zuletzt geprüft am 12.07.2009.

Wild, S; Roglic, G; Green, A; Sicree, R; King, H: *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. In: *Diabetes care* (2004), Jg. 27, H. 5, S. 1047–1053.

World Health Organisation Department of Noncommunicable Disease Surveillance (1999): *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. Herausgegeben von Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Online verfügbar unter http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf.

World Health Organization (Hg.) (1998): *Obesity*. Preventing and managing the global epidemic; report of a WHO consultation on obesity Geneva, 3-5 June 1997. Geneva: WHO.

World Health Organization: *Obesity*. Preventing and managing the global epidemic ; report of a WHO consultation (2000). Geneva: World Health Organization.

WHO | *Diabetes* (2009). World Health Organization. Online verfügbar unter http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/, zuletzt aktualisiert am 15.09.2009, zuletzt geprüft am 15.09.2009.

Yanagawa, S-i; Matsuda, Y; Lee, J-S; Matsubayashi, H; Sese, S; Kadowaki, T; Ishimoto, A: *Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila*. In: *The EMBO journal* (2002), Jg. 21, H. 7, S. 1733–1742. Online verfügbar unter doi:10.1093/emboj/21.7.1733.

Yoon, K H; Ko, S H; Cho, J H; Lee, J M; Ahn, Y B; Song, K H et al.: *Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea*. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2003), Jg. 88, H. 5, S. 2300–2308.

Zhang, Y; Proenca, R; Maffei, M; Barone, M; Leopold, L; Friedman, J M: *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. In: *Nature* (1994), Jg. 372, H. 6505, S. 425–432. Online verfügbar unter doi:10.1038/372425a0.