# Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden

Regulation der Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs durch metabolische und pharmakologische Stimuli in pankreatischen beta-Zellen und die Rolle von Wnt4 für die Physiologie der pankreatischen beta-Zelle

**Dissertation** 

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Charlotte Heller

2013

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

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan Referent: Priv.-Doz. Dr. Schinner Korreferent: Prof. Dr. Schulz Meiner Familie in Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heller C., Kühn M. C., Mülders-Opgenoorth B., Schott M., Willenberg H. S., Scherbaum W. A., Schinner S.: Exendin-4 upregulates the expression of Wnt-4, a novel regulator of pancreatic beta-cell proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301: E864-E872, 2011

# Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisV				
Ab	bildu	ingsver	zeichnis	x
Та	belle	nverzei	chnis	XII
Ab	okürzı	ungsve	rzeichnis	XIII
1	Einl	eitung.		1
	1.1	Diabet	es mellitus	1
		1.1.1	Definition, Klassifikation und Epidemiologie des Diabetes me	ellitus 1
		1.1.2	Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	3
	1.2	Antidia	abetika	8
		1.2.1	GLP-1 basierte Therapien	8
		1.2.2	Metformin	10
		1.2.3	Sulfonylharnstoffe	11
		1.2.4	Thiazolidindione	12
		1.2.5	Insulin	13
	1.3	Der W	nt-Signalweg	14
		1.3.1	Forschungsursprung des Wnt-Signalwegs	14
		1.3.2	Komponenten des Wnt-Signalwegs	14
		1.3.3	Die Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs	16
		1.3.4	Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs für die	
			pankreatische beta-Zelle	17
	1.4	Ziel de	er Arbeit	23
2	Mat	erial un	d Methoden	24
	2.1	Materia	al	24
		2.1.1	Reagenzien	24
		2.1.2	Medien	27
		2.1.3	Lösungen und Puffer	28
		2.1.4	Gele	29
		2.1.5	Verbrauchsmaterialien	29

	2.1.6	Geräte		31	
2.2	Methoden				
	2.2.1	Allgemeine Zellkultur			
	2.2.2	Stimulatio	onen von INS-1 beta-Zellen	34	
		2.2.2.1	Stimulation mit Antidiabetika	34	
		2.2.2.2	Stimulation mit Exendin-4 für unterschiedliche		
			Stimulationsdauer	35	
		2.2.2.3	Stimulation mit Exendin-4 und Exendin-(9-39)	35	
		2.2.2.4	Stimulation mit Exendin-4 und unterschiedlichen		
			Glukosekonzentrationen	35	
		2.2.2.5	Langzeitstimulation mit Exendin-4	36	
		2.2.2.6	Stimulation mit GLUTag-konditioniertem Medium	36	
		2.2.2.7	Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen.	36	
		2.2.2.8	Langzeitstimulation mit unterschiedlichen		
			Glukosekonzentrationen	37	
	2.2.3	Isolation of	der murinen pankreatischen Langerhans'schen Inseln	37	
	2.2.4	Stimulatio	on der murinen pankreatischen Langerhans'schen Inseln .	38	
		2.2.4.1	Stimulation mit Exendin-4	38	
		2.2.4.2	Stimulation mit Wnt4	39	
	2.2.5	RNA-Isola	ation	39	
		2.2.5.1	RNA-Isolation aus INS-1 beta-Zellen	39	
		2.2.5.2	RNA-Isolation aus primären murinen Langerhans'schen		
			Inseln	40	
	2.2.6	Photomet	rische Messung der RNA-Konzentration	41	
	2.2.7	Reverse <sup>-</sup>	Transkription	41	
	2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion43			
	2.2.9	Zelllyse zur Proteinextraktion			
	2.2.10	Proteinbestimmung5			
	2.2.11	Western Blot5			
	2.2.12	Transiente Transfektion von INS-1 beta-Zellen5			
	2.2.13	Reverse -	Transfektion von INS-1 beta-Zellen mit Wnt4-spezifischer		
		siRNA		60	
	2.2.14	Bestimmu	ung der Proliferation von INS-1 beta-Zellen unter Wnt4-		
		spezifisch	nem Knockdown	63	

		2.2.15 Messung der Insulinsekretion	64
		2.2.16 Statistische Analyse	69
3	Erge	ebnisse	70
	3.1	Regulation der mRNA-Expressionen von Wnt-Signalmolekülen durch Antidiabetika und verschiedene Glukosekonzentrationen in INS-1 beta- Zellen	70
	3.2	Expression von Wnt-Signalmolekülen in INS-1 beta-Zellen unter chronischer Stimulation mit niedriger, mittlerer und hoher Glukosekonzentration	76
	3.3	Expression von Wnt4 unter Stimulation mit Exendin-4 in primären Langerhans'schen Inseln der Maus	78
	3.4	Expression von Wnt4-Protein unter Stimulation mit Exendin-4 in INS-1 beta-Zellen	78
	3.5	Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an Exendin-4	80
	3.6	Expression von Wnt4 unter Stimulation mit Exendin-4 in INS-1 beta-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit	81
	3.7	Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter chronischer Stimulation mit Exendin-4	82
	3.8	Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 und dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39)	83
	3.9	Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit L-Zell- konditioniertem Medium	84
	3.10	Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 und verschiedenen Glukosekonzentrationen	86
	3.11	Einfluss von Wnt4 auf die Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt- Signalwegs in INS-1 beta-Zellen	87
	3.12	Einfluss von endogenem Wnt4 auf die basale Proliferation von INS-1 beta-Zellen	89
	3.13	Expression von Zyklin D1 unter Wnt4-Knockdown in INS-1 beta-Zellen	90

	3.14	Wirkung von Wnt4 auf die Insulingenexpression und die Insulinsekretion	
		von primären murinen Langerhans'schen Inseln	91
4	Disk	ussion	94
	4.1	Exendin-4 verstärkt die Expression von Wnt4 in pankreatischen beta- Zellen	94
	4.2	Exendin-4 inhibiert die Wnt-Liganden-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen	95
	4.3	Physiologische Bedeutung von Wnt4 als Modulator der kanonischen Wnt- Signalaktivität in pankreatischen beta-Zellen	98
	4.4	Wnt4 als Regulator der pankreatischen beta-Zellmasse	99
	4.5	Wirkung von Wnt4 auf die Insulinexpression und Insulinsekretion von pankreatischen beta-Zellen1	01
5	Zusa	ammenfassung1	03
6	Literaturverzeichnis104		04
7	Eidesstattliche Versicherung12		21

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1	5
Abb. 1.1.2	6
Abb. 1.3.1	17
Abb. 2.2.1	45
Abb. 2.2.2	48
Abb. 2.2.3	49
Abb. 2.2.4	53
Abb. 2.2.5	54
Abb. 2.2.6	61
Abb. 2.2.7	63
Abb. 2.2.8	68
Abb. 3.1.1	71
Abb. 3.1.2	72
Abb. 3.1.3	73
Abb. 3.1.4	74
Abb. 3.1.5	75
Abb. 3.2.1	77
Abb. 3.3.1	78
Abb. 3.4.1	79
Abb. 3.4.2	80
Abb. 3.5.1	81
Abb. 3.6.1	82
Abb. 3.7.1	83
Abb. 3.8.1	84
Abb. 3.9.1	85
Abb. 3.10.1	86
Abb. 3.11.1	88
Abb. 3.11.2	89
Abb. 3.12.1	90
Abb. 3.13.1	91
Abb. 3.14.1	92
Abb. 3.14.2	93

Abb. 4.2.1	
Abb. 4.4.1	

# Tabellenverzeichnis

Tab. 2.2.1	35
Tab. 2.2.2	42
Tab. 2.2.3	42
Tab. 2.2.4	46
Tab. 2.2.5	
Tab. 2.2.6	50
Tab. 2.2.7	51
Tab. 2.2.8	51
Tab. 2.2.9	52
Tab. 2.2.10	62
Tab. 2.2.11	66
Tab. 2.2.12	68

# Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APC-Protein	Adenomatous Polyposis Coli-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (base pairs)
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent Protein Kinases II
cDNA	complementary DNA
CK-1α	Casein Kinase-1alpha
cpm	counts per minute
Ct	Threshold Cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
dn-TCF7L2	Dominant-negativer T cell-specific Transcription Factor 7-like 2
DPP-IV	Dipeptidyl-Peptidase IV
Exd-(9-39)	Exendin-(9-39)
Exd-4	Exendin-4
FKS	Fetales Kälberserum
Fzd-4	Frizzled-4
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GSK-3β	Gykogen-Synthase-Kinase-3beta
HRP	Horseradish-Peroxidase
IDF	Internationale Diabetes Föderation
IL-6	Interleukin-6
INS-1	Insulinoma-Rattenzelllinie
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LKB1	liver kinase B1
LRP	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein

MAP	Mitogen-activated Protein
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PI <sub>3</sub> K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
РКВ	Proteinkinase B
PPAR	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleinacid)
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
siRNA	small interfering RNA
TCF	T cell-specific Transcription Factor
TCF7L2	Transcription Factor 7-like 2
TF	Transkriptionsfaktor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
U/ml	Einheiten/ml
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study

# 1 Einleitung

#### 1.1 Diabetes mellitus

#### 1.1.1 Definition, Klassifikation und Epidemiologie des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist definiert als eine Regulationsstörung des Stoffwechsels, die durch den Leitbefund der chronischen Hyperglykämie charakterisiert ist. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zu Grunde (American Diabetes Association, 2012).

In den letzten Jahrzehnten konnte eine dramatische Zunahme der Inzidenz und der Prävalenz des Diabetes mellitus beobachtet werden. Gab es im Jahr 2011 noch 366 Millionen Menschen mit Diabetes mellitus, so wird ihre Zahl laut der Internationalen Diabetes Föderation (IDF) für das Jahr 2030 auf 552 Millionen geschätzt (Whiting et al., 2011). Es werden zwei Hauptformen unterschieden:

Der Diabetes mellitus Typ 1 entsteht durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden pankreatischen beta-Zellen. Daraus resultiert ein absoluter Insulinmangel, der sich an klassischen Symptomen wie Polydipsie, Polyurie, Gewichtsverlust und Ketoazidose zeigt. Als Ursache liegt meist ein chronischer Autoimmunprozess zu Grunde. 5-10 % aller Diabetiker haben einen Diabetes mellitus Typ 1 (American Diabetes Association, 2012).

Den Großteil aller Diabeteserkrankungen macht der Diabetes mellitus Typ 2 aus. Dieser ist durch eine abnorme Insulinsekretion charakterisiert, welche mit unterschiedlich schwer ausgeprägter Insulinresistenz einhergeht. Die drastische epidemiologische Entwicklung wird v. a. durch die Zunahme der Fälle an Diabetes mellitus Typ 2 erklärt. Diese kann sowohl in den Industrienationen als auch zu einem großen Maß in Entwicklungsländern beobachtet werden (Chen et al., 2012).

Die Ursachen für die Progredienz der Diabetesprävalenz können unterteilt werden in genetische und nicht-genetische Faktoren. Zu den Letztgenannten zählen auf der einen Seite eine allgemeine Verlängerung der Lebenserwartung und eine frühere Diagnosestellung. Auf der anderen Seite kommen moderne Lebensstiländerungen in Betracht, die charakterisiert sind durch eine erhöhte Energiezufuhr bei gleichzeitig bestehender körperlicher Inaktivität, wodurch es zu einer Zunahme und einem früheren Beginn von Übergewicht und Adipositas kommt (Herder et al., 2011). Dass beim Diabetes mellitus Typ 2 aber auch eine genetische Komponente eine erhebliche Rolle spielt, zeigen die hohen Konkordanzen von 41 bis 55 % bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu einer Konkordanzrate von 10 bis 15 % bei dizygoten Zwillingen, ein deutlich erhöhtes Diabetesrisiko von 40 % bei einem erkrankten Elternteil bzw. von 70 % bei beiden betroffenen Eltern (Ahlqvist et al., 2011). Es wird angenommen, dass für den Diabetes mellitus Typ 2 eine hohe genetische Suszeptibilität besteht, auf deren Boden, getriggert durch veränderte oder neue Umwelt- und Lebensbedingungen, es häufiger zur Manifestation der Erkrankung kommt. Bisher sind über 30 Genloki gefunden worden, die eine signifikante Assoziation mit der Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 zeigen. Die stärksten Assoziationen sind für bestimmte Polymorphismen innerhalb des für TCF7L2 kodierenden Gens gefunden worden, einem Wnt-regulierten Transkriptionsfaktor (Florez et al., 2006; Grant et al., 2006; Herder et al., 2011).

Die chronische Hyperglykämie führt über eine Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen vorwiegend an Augen und Nieren und zur Polyneuropathie. Über die diabetesassoziierte Makroangiopathie kommt es zu Folgeerkrankungen an Herz, Gehirn und peripheren Arterien. Kardiovaskuläre Erkrankungen erklären die hohe Morbidität und Mortalität der Diabetiker, wobei die koronare Herzkrankheit die häufigste Todesursache darstellt. Die jährliche Durchschnittsmortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 beträgt 5,4 % und ist damit doppelt so hoch wie bei altersgleichen Nichtdiabetikern. Die Lebenserwartung für Typ 2 Diabetiker ist im Mittel um fünf bis zehn Jahre reduziert (Lorenzo et al., 2006).

Diabetes mellitus Typ 2 ist im Rahmen des metabolischen Syndroms häufig mit abdomineller Adipositas, Dyslipoproteinämie und essenzieller Hypertonie vergesellschaftet. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Prävention der diabetischen Folgeerkrankungen zu beachten. Obwohl ein Benefit der antihyperglykämischen Therapie im Bezug auf das Auftreten von mikro- und makrovaskulären Komplikationen gezeigt werden konnte, ist für eine optimale Therapie auch die Behandlung der übrigen Krankheiten des metabolischen Syndroms essenziell (Gaede et al., 2003; Matthaei et al., 2009).

Die Behandlung des Diabetes mellitus und seiner Folgeerkrankungen bedeutet für die nationalen Gesundheitssysteme eine schwere ökonomische Last. Die Gesundheitsausgaben für Diabetes mellitus wurden für das Jahr 2011 auf 11,6 % aller Gesundheitsausgaben weltweit geschätzt. Dies ergibt laut IDF eine absolute Summe von 465 Milliarden US-Dollar. Bis zum Jahr 2030 ist ein Anstieg auf mindestens 595 Milliarden US-Dollar zu erwarten (International Diabetes Federation, 2011).

In Anbetracht der epidemiologischen Entwicklung und der ökonomischen Folgen stellt der Diabetes mellitus ohne Zweifel eines der bedeutsamsten Gesundheitsprobleme des einundzwanzigsten Jahrhunderts dar (Chen et al., 2012).

#### 1.1.2 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 wird durch Störungen innerhalb eines komplexen Zusammenspiels zwischen Insulinsensitivität und Insulinsekretion bestimmt. Der Diabetes mellitus Typ 2 manifestiert sich, wenn durch ein beta-Zellversagen die gebildete Insulinmenge nicht mehr ausreicht, den erhöhten Insulinbedarf zu kompensieren, der unter einer Insulinresistenz entsteht (Schinner et al., 2005).

Insulin reguliert die zelluläre Glukoseaufnahme und die Konzentrationen an freien Fettsäuren im Serum hauptsächlich durch Wirkungen an seinen Zielorganen Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber. Im Fettgewebe hemmt Insulin die Lipolyse und reduziert daher die Abgabe von freien Fettsäuren aus den Adipozyten in den Körperkreislauf. Durch inhibierende Wirkungen auf die Aktivität von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese hemmt es die Glukoseabgabe aus der Leber in das Blut. In der Skelettmuskulatur wird die Glukoseaufnahme durch vermehrten Einbau von insulinabhängigen Glukosetransportern in die Plasmamembran gefördert (DeFronzo, 2004).

Eine Insulinresistenz ist gekennzeichnet durch eine verminderte Sensitivität der Hauptzielorgane für Insulin. Die Insulinresistenz ist multifaktoriell bedingt (Kahn, 2003). Als einer der wichtigsten Faktoren gilt die Dysfunktion der Adipozyten (Burke et al., 1999; Schinner et al., 2005). Die Resistenz der Adipozyten gegenüber dem antilipolytisch wirksamen Insulin spielt hierbei eine wichtige Rolle und führt zu einer erhöhten Abgabe von freien Fettsäuren in das Plasma. Die Lipide akkumulieren vermehrt in ektopen Organen wie Leber und Muskulatur, wo sie die Insulinsensitivität herabsetzen. Die hierfür verantwortlichen genauen molekularen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird dem Konzept einer mitochondrialen Dysfunktion in Rahmen der Fettsäure-induzierten Insulinresistenz sowohl in Leber als auch in der Skelettmuskulatur eine entscheidende Bedeutung zugesprochen (Martins et al., 2012; Roden, 2006). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sowohl der Mitochondriengehalt als auch die Mitochondrienfunktion in insulinresistenten Personen herabgesetzt sind (Holloway et al., 2007; Schrauwen-Hinderling et al., 2007). Unter dem Einfluss der bei der Oxidation der akkumulierten Fettsäuren vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies kommt es zur Aktivierung verschiedener Kinasen, wie der c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und verschiedener Unterformen der Proteinkinase C. Diese Kinasen führen zur Serin/Threonin-Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates-1 (IRS-1) und verhindern damit die Insulin-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von IRS-1. Folglich kommt es zu Störungen des unter physiologischen Bedingungen durch Insulin aktivierten PI<sub>3</sub>K/PKB-Signalwegs (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B) (Martins et al., 2012). Diese machen sich durch eine reduzierte Glukoseaufnahme aufgrund verminderten Einbaus des Glukosetransporters GLUT4 in die Plasmamembranen sowie durch weitere Störungen der von der Proteinkinase B regulierten Effekte bemerkbar, zu denen u. a. die Stimulation der Glykogensynthese und die Hemmung der Glukoneogenese gehören. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es unter den vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und Fettsäuremetaboliten zu einer Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen, wie dem NFkB-Signalweg, in Hepatozyten kommt. Die hierdurch vermehrt gebildeten proinflammatorische Zytokine wie TNFalpha und verschiedene Interleukine können die Insulinresistenz der Zellen herabsetzen (Cai et al., 2005). Im Einklang hiermit konnte gezeigt werden dass auch die Adipozyten ein verändertes Sekretionsprofil der sogenannten Adipokine aufweisen, wie z. B. Adiponektin, IL-6 und auch TNFalpha (Schinner et al., 2005). Diese von den Fettzellen sezernierten Botenstoffe haben sowohl auto-, para- und endokrine Wirkungen. Das Konzept einer chronischen subklinischen Inflammation schreibt ihnen eine ursächliche Wirkung für die Entstehung einer Insulinresistenz unter Adipositas zu. Im Plasma adipöser Menschen werden häufig erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen gefunden, die zu einer Abnahme der Insulinsensitivität führen können (Dandona et al., 2004; Zeyda et al., 2009).

Eine Insulinresistenz führt so lange nicht zu der Entwicklung einer Hyperglykämie wie sie durch gleichzeitige Hyperinsulinämie kompensiert werden kann (Guillausseau et al., 2003; Weir et al., 2001). Die Insulinsekretion insulinresistenter, nicht-diabetischer Menschen ist proportional zur Schwere der Insulinresistenz erhöht, sodass die Glukosetoleranz nicht abnimmt. Die beta-Zellen sind also in der Lage, ihre Insulinsekretion an die Schwere der Insulinresistenz anzupassen (DeFronzo, 2004). Die Hyperinsulinämie kann einerseits durch eine erhöhte funktionale Responsivität der bereits bestehenden beta-Zellen und andererseits durch eine Vermehrung der beta-Zellmasse oder auch beides zu Stande kommen (Butler et al., 2003a; Kahn et al., 2006; Polonsky et al., 1988b; Polonsky et al., 1988a) (vgl. Abb. 1.1.1).



**Abb. 1.1.1** Aufrechterhaltung einer Normoglykämie unter Insulinresistenz durch gesteigerte Insulinsekretion

Als Ursache für die Mehrsekretion an Insulin und relativ erhöhtem Blutzucker werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dazu gehören ein erhöhter intrazellulärer Glukosemetabolismus der beta-Zelle, Förderung der Insulinsekretion durch direkte Wirkungen von freien Fettsäuren an der beta-Zelle und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Inkretinen (Kahn, 2003).

Eine Vermehrung der funktionalen beta-Zellmasse bei Insulinresistenz konnte in zahlreichen Tiermodellen dargestellt werden (Butler et al., 2003b; Tomita et al., 1992) und es ist anzunehmen, dass dieser Prozess auch beim Menschen eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Hyperinsulinämie spielt (Butler et al., 2003a; Kahn, 2003; Polonsky et al., 1988a; Yoon et al., 2003). Die beta-Zellmasse unterliegt der balancierten Regulation zwischen beta-Zellwachstum (Replikation und Neogenese) und beta-Zellapoptose (Weir et al., 2004). Man geht davon aus, dass der Zellreplikation in Bezug auf die Zunahme der beta-Zellmasse die größte Bedeutung zukommt, wie in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte (Bonner-Weir, 2000; Butler et al., 2003b; Dor et al., 2004). Ob auch beim Menschen die Replikation den größten Teil zur Vermehrung der beta-Zellmasse unter Insulinresistenz beiträgt, ist nicht eindeutig geklärt. Zumindest die physiologische postnatale Expansion der beta-Zellmasse geht auf eine hohe Rate an beta-Zellreplikation zurück (Meier et al., 2008).

Die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist durch ein sekundäres beta-Zellversagen gekennzeichnet. Hierbei versagen im zeitlichen Verlauf diejenigen Adaptationsmechanismen, durch welche zunächst die Aufrechterhaltung einer normalen Glukosetoleranz ermöglicht wurde. Unter einer zunehmenden Insulinresistenz reicht die Hyperinsulinämie nicht mehr aus, um den erhöhten Insulinbedarf der peripheren Gewebe zu decken. Es entwickelt sich zunächst eine verminderte Glukosetoleranz. Während der Progression der verminderten Glukosetoleranz zum manifesten Diabetes mellitus sinken nun die zunächst hohen Insulinsekretionsraten. Auch bei gleich bleibender Insulinresistenz resultiert dies in einer kontinuierlichen Zunahme eines relativen Insulinmangels, gekennzeichnet durch ansteigende Glukosewerte. Im weiteren Verlauf kann sich auch ein absoluter Insulinmangel entwickeln (DeFronzo, 2004) (vgl. Abb. 1.1.2).



Abb. 1.1.2 Hyperglykämie unter Insulinresistenz durch sekundäres beta-Zellversagen

Es kommt also zu einem progressiven Versagen der Adaptationsmechanismen der beta-Zelle an die bestehende Insulinresistenz. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass eine beta-Zelldysfunktion früh in der Entwicklung eines Diabetes mellitus vorliegt und zwar bereits in einem Stadium, in dem noch eine normale Glukosetoleranz besteht (Kahn, 2001; Saad et al., 1989). Ergebnisse der UKPDS-Studie zeigen eine zum Diagnosezeitpunkt des Diabetes mellitus um 50 % reduzierte beta-Zellfunktion und eine fortschreitende Abnahme in den darauf folgenden Jahren unabhängig von der Art der Behandlung (U. K. prospective diabetes study 16, 1995). Frühe funktionale Defekte der beta-Zelle zeigen sich u. a. an einem Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion nach intravenösen Glukosegabe (Del Prato et al., 2001), in einem veränderten pulsatilen Muster der basalen Insulinsekretion (O'Rahilly et al., 1988) und einer verminderten Konversion von Proinsulin zu Insulin (Bergman et al., 2002; Pradhan et al., 2003).

Welche Mechanismen zum Versagen der beta-Zellfunktion führen, ist im Detail noch nicht geklärt. Eine genetische Prädisposition scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Lencioni et al., 2008; Mussig et al., 2010; Talchai et al., 2009). Beobachtet wurden ein verminderter Inkretineffekt, direkte Wirkungen von Adipokinen auf die Insulinsekretion (Kulkarni et al., 1997) und eine reduzierte beta-Zellmasse (DeFronzo, 2004; Donath et al., 2003; Kulkarni et al., 1997).

Die verminderte beta-Zellmasse konnte in Tiermodellen zum Diabetes mellitus (Butler et al., 2003b; Finegood et al., 2001; Pick et al., 1998) und auch an humanen Pankreata (Butler et al., 2003a; Clark et al., 1988; Kloppel et al., 1985; Rahier et al., 2008; Saito et al., 1979; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003) beschrieben werden. Der Hauptmechanismus wird in einer erhöhten Apoptoserate der beta-Zellen vermutet (Butler et al., 2003b; Butler et al., 2003a; Donath et al., 1999; Marchetti et al., 2004). Faktoren, die zur verstärkten Apoptose führen, sind noch nicht endgültig identifiziert worden. Es scheint allerdings, dass chronisch erhöhte Spiegel an Glukose und Lipiden diesen beta-Zelluntergang begünstigen können - ein Vorgang, der mit dem Begriff der Glukolipotoxizität beschrieben wird (Poitout et al., 2008). Auch die toxisch wirkenden Oligomeren des sogenannten Insel-Amyloid-Polypeptids, eines Peptids, das mit Insulin kosezerniert wird, scheinen bei der Induktion der beta-Zellapoptose eine Rolle zu spielen (Marchetti et al., 2008; Meier et al., 2006).

Da das Versagen der beta-Zellen gekennzeichnet ist durch verminderte Insulinsekretion und reduzierte beta-Zellmasse, gilt das wissenschaftliche Interesse der Aufklärung molekularer Mechanismen, die an der Regulation von Proliferation und Insulinsekretion beteiligt sind. Dem kanonischen Wnt-Signalweg, welcher Gegenstand dieser Arbeit ist, wird in eben diesen Funktionen durch aktuelle Arbeiten eine wichtige Rolle zugewiesen.

## 1.2 Antidiabetika

#### 1.2.1 GLP-1 basierte Therapien

Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) und Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) gehören zur Gruppe der Inkretine (**In**testinal Se**cre**tion of Insul**in** = Incretin). Inkretine sind Peptidhormone, die von endokrin aktiven Zellen des Gastrointestinaltrakts nach Nahrungsaufnahme in das Blut sezerniert werden und zur Regulation der Glukosehomeostase beitragen (Baggio et al., 2007).

GLP-1 und GIP sind für den sogenannten Inkretin-Effekt verantwortlich. Darunter versteht man das Phänomen, dass eine orale Glukoseaufnahme zu einer stärkeren Insulinsekretion führt als die gleiche Menge intravenös zugeführter Glukose (McIntyre N et al., 1964; Wajchenberg, 2007). GLP-1 scheint für den Inkretin-Effekt die bedeutendere Rolle zu spielen (Kreymann et al., 1987). Es entsteht in L-Zellen von distalem lleum, Kolon und Rektum durch posttranslationale Prozessierung von Proglukagon, aus dem ebenfalls das Glukagon in pankreatischen alpha-Zellen hervorgeht (Kieffer et al., 1999).

Der für die wichtige Potenzierung der Insulinsekretion unter oraler Glukoseaufnahme verantwortliche Inkretin-Effekt ist bei Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 reduziert bzw. aufgehoben (Nauck et al., 1986; Neumiller, 2009). Die Sekretion von GLP-1 bei Diabetikern wurde als reduziert (Toft-Nielsen et al., 2001; Vilsboll et al., 2001), die GIP-Sekretion dagegen als erhöht beschrieben (Nauck et al., 2004; Neumiller, 2009). Jedoch lässt sich durch GIP bei Diabetikern kein insulinotroper Effekt mehr auslösen, wohingegen gezeigt werden konnte, dass unter exogen zugeführtem GLP-1 bei Diabetikern durchaus noch normale Werte der Insulinsekretion unter gleichzeitiger Glukosezufuhr erreicht werden können (Nauck et al., 1993). Dieser Unterschied lässt GLP-1-basierte Therapien als effektive Methode zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 in Erscheinung treten (Neumiller, 2009).

GLP-1 führt durch verschiedene Wirkmechanismen zur Senkung der Blutglukosewerte. Dazu gehören die glukoseabhängige Stimulation der Insulinsekretion, die Inhibition der Glukagonsekretion, die verminderte hepatische Glukoseabgabe, die verzögerten Magenentleerung und die Induktion des Sättigungsgefühls (Wajchenberg, 2007). In *in vitro* Studien zeigten sich auf molekularer Ebene eine verstärkte Insulingentranskription (Drucker et al., 1987) und Insulinbiosynthese (Alarcon et al., 2006) und zudem eine erhöhte Expression von für die Insulinsekretion regulatorisch wichtigen Molekülen nach Stimulation mit GLP-1, wie z. B. der Glukokinase (Murao et al., 2009; Wajchenberg, 2007).

In verschiedenen Tierversuchen konnte bereits eine vermehrte beta-Zellmasse unter GLP-1-Stimulation beschrieben werden (Kim et al., 2003; Rolin et al., 2002; Stoffers et al., 2000; Perfetti et al., 2000). Die Mechanismen, über die GLP-1 zu einer Steigerung der beta-Zellmasse führt, liegen in einer gesteigerten beta-Zellproliferation, der Induktion der Neogenese und der Inhibition der beta-Zellapoptose (Brubaker et al., 2004). In Anbetracht der Tatsache, dass Diabetes mellitus Typ 2 eine progressive Erkrankung ist, was sich an einer kontinuierlich abnehmenden Masse an funktionalen beta-Zellen zeigt, liegt gerade in diesen beta-Zell-protektiven Effekten die Hoffnung, mit den GLP-1 basierten Therapien auf Behandlungsmöglichkeiten gestoßen zu sein, die zum langfristigen Erhalt der beta-Zellmasse führen können.

Die Datenlage zur Wirkung von GLP-1 auf humane beta-Zellen ist naturgemäß schwächer als in Tiermodellen. *In vitro* Studien von Farilla et al. an isolierten humanen beta-Zellen konnten einen inhibitorischen Effekt von GLP-1 auf die beta-Zellapoptose über einen Zeitraum von fünf Tagen zeigen. Die mit GLP-1 stimulierten pankreatischen Inseln wiesen zudem eine verbesserte Glukose-stimulierte Insulinsekretion und einen erhöhten Insulingehalt auf (Farilla et al., 2003).

Buteau et al. zeigten, dass isolierte humane Langerhans'sche Inseln gesunder Organspender vor glukose- und palmitatinduzierter Apoptose durch GLP-1 geschützt werden können (Buteau et al., 2004). Weitere Studien zeigen die Differenzierung humaner duktaler Progenitorzellen zu funktionalen beta-Zellen unter GLP-1-Stimulation (Abraham et al., 2002; Hui et al., 2001; Zhou et al., 2002).

GLP-1 hat eine Plasmahalbwertszeit von wenigen Minuten, da es durch das Enzym Dipetidyl-Peptidase IV (DPP-IV) mittels proteolytischer Spaltung rasch zu inaktiven Metaboliten degradiert wird (Kieffer et al., 1999). Als Antidiabetika werden daher einerseits DPP-IV-resistente GLP-1-Rezeptor-Analoga, wie Exenatid und Liraglutid, und andererseits DPP-IV-Inhibitoren, wie Sita-, Saxa- und Vildagliptin, zur Therapie eingesetzt (Neumiller, 2009). Eine Zusammenstellung der Ergebnisse randomisiert-kontrollierter klinischer Studien zeigt, dass beide Klassen der Inkretintherapie effektive Optionen für die Behandlung der Hyperglykämie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 darstellen (White, 2009). Ob sie allerdings langfristig die Progression der Erkrankung verzögern bzw. aufheben können, kann zum heutigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Exenatid ist synthetisch hergestelltes Exendin-4. Exendin-4 stammt ursprünglich aus dem Speichel des Gila Monsters (Heloderma suspectum, Krustenechse) und weist eine 53 %-ige Homologie seiner Aminosäuresequenz zum nativen GLP-1 auf (Kieffer et al., 1999). Es bindet als hochaffiner Agonist an den G-Protein-gekoppelten GLP-1-Rezeptor und zeigt zum humanen GLP-1 vergleichbare glukoregulatorische Wirkungen (Neumiller, 2009; Wajchenberg, 2007). Es hat im Unterschied zu GLP-1 ein Glycin an Position 2 seiner Aminosäuresequenz und ist daher kein Substrat für die DPP-IV (Chen et al., 2007; Kieffer et al., 1999). In *in vitro* Studien an Zelllinien und in Tiermodellen konnte auch für Exendin-4 eine proliferationsfördernde Wirkung auf pankreatische beta-Zellen gezeigt werden (Arakawa et al., 2009; Liu et al., 2008; Song et al., 2008; Xu et al., 1999). GLP-1 und Exendin-4 führen zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen und die proliferative Wirkung von Exendin-4 auf die beta-Zellen wird zum Teil über einen intakten Wnt-Signalweg vermittelt (Liu et al., 2008).

#### 1.2.2 Metformin

Die antihyperglykämische Wirkung des zu der Klasse der Biguanide gehörenden Metformins beruht vor allem auf der Verminderung der hepatischen Glukoseproduktion, die durch Hemmung der Glukoneogenese erreicht wird. Metformin vermindert zusätzlich die Glukoseabsorption aus dem Intestinum und verbessert die periphere Insulinsensitivität (Prager et al., 1986; DeFronzo et al., 1991; Stumvoll et al., 1995; Natali et al., 2006). Metformin führt zu einer Reduktion der freien Fettsäuren und der Lipidoxidationsrate (Widen et al., 1992). Auf molekularer Ebene konnte ein verstärkter Einbau der GLUT4-Glukosetransporter in die Membran von Rattenmuskel- und -fettzellen beschrieben werden, wodurch die Insulin-vermittelte Glukoseaufnahme in die Zellen gesteigert wurde (Hundal et al., 1992; Klip et al., 1992; Kozka et al., 1993; Matthaei et al., 1991a; Matthaei et al., 1991b; Matthaei et al., 1992).

Die genauen molekularen Mechanismen, durch die Metformin seine antihyperglykämischen Wirkungen erzielt, sind noch nicht vollständig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Metformin mittels der sogenannte Serin/Threonin-Kinase LKB1 (liver kinase B1) eine Inhibition der hepatischen Glukoneogenese bewirkt. Diese Kinase führt einerseits zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der 5'-Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und andererseits über einen mTOR-vermittelten (mammalian Target of Rapamycin) Signalweg zur einer verminderten Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, einem Schlüsselenzym der Glukoneogenese (Phielix et al., 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Metformin auch unabhängig davon den Komplex I der Atmungskette in Hepatozyten direkt inhibieren kann. Das dadurch verminderte ATP/ADP-Verhältnis und der Anstieg von NADH führen neben weiteren Effekten zu einer Abnahme der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase und somit zur Inhibition der Glukoneogenese (Owen et al., 2000). Die AMPK spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukose- und des Lipidstoffwechsels (Hardie et al., 2006). Unter einem Anstieg des zellulären AMP/ATP-Verhältnisses führt sie zur Aktivierung von ATP-produzierenden katabolen Signalwegen und zur Hemmung von ATP-verbrauchenden anabolen Signalwegen, wie der Glukoneogenese (Hardie, 2011). Die AMPK wird auch in pankreatischen beta-Zellen exprimiert (Winder et al., 1999). Direkte Wirkungen von Metformin auf die beta-Zellen sind nachgewiesen worden. Neben den in vivo nachgewiesenen erhöhten Plasmakonzentrationen von GLP-1 unter Metforminstimulation (Mannucci et al., 2001; Yasuda et al., 2002), wurde an INS-1 beta-Zellen und auch an isolierten pankreatischen Inselzellen der Maus gezeigt, dass Metformin abhängig von PPAR-alpha zu einer verstärkten Expression des GLP-1-Rezeptors auf beta-Zellen führt (Pan et al., 2009). Der Effekt von GLP-1 auf die Insulinsekretion der beta-Zellen wurde signifikant durch Stimulation mit Metformin verstärkt (Cho et al., 2011; Maida et al., 2011).

#### 1.2.3 Sulfonylharnstoffe

Sulfonylharnstoffe binden an einen ATP-sensitiven Kaliumkanal (K<sub>ATP</sub>-Kanal), der sich in der Zellmembran der beta-Zellen befindet. Dieser K<sub>ATP</sub>-Kanal besteht aus zwei Untereinheiten, die in einer 4:4 Stöchiometrie vorliegen (Mark, 2002). Dies ist zum einen die porenformende Einheit Kir6.2 und zum anderen der Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 als regulatorische Einheit (Burke et al., 2008). Die Bindung der Sulfonylharnstoffe an den K<sub>ATP</sub>-Kanal beruht prinzipiell auf einer niederaffinen Bindung an die Kir6.2-Einheit und aus einer hochaffinen Bindung an die SUR1-Einheit (Mark, 2002). Diese Bindung führt zu einer Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der ATP-sensitiven Kaliumkanäle. Folglich kommt es zu einer Depolarisation der beta-Zellmembran. Diese Depolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in der Zellmembran. Der dadurch induzierte Kalziuminflux erhöht die zytosolische Kalziumkon-zentration, die dann schließlich zur Freisetzung von Insulin aus den insulinspeichernden

Vesikeln in das Blut führt (Reimann et al., 2003). Aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe wurde für die Versuche dieser Arbeit Tolbutamid verwendet.

#### 1.2.4 Thiazolidindione

Rosiglitazon gehört zu den Thiazolidindionen, welche als Aktivatoren von PPAR-gamma wirken (Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor gamma). Der nukleäre Rezeptor PPAR-gamma bindet als Heterodimer mit dem 9-cis-Retinsäure-Rezeptor (RXR) an responsiven Elementen von zahlreichen in Lipid- und Glukosemetabolismus involvierten Genen und kann dadurch deren Transkription regulieren (Wajchenberg, 2007). PPAR-gamma wird vor allem im Fettgewebe exprimiert, kommt aber auch in anderen Organen und Geweben vor, wie in der Leber, der Skelettmuskulatur und auch in pankreatischen Langerhans'schen Inseln (Dubois et al., 2000; Tontonoz et al., 1994a). PPAR-gamma nimmt eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Differenzierung von Adipozyten ein (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1994b).

Thiazolidindione werden auch als Insulin-Sensitizer bezeichnet, da sie die Responsivität der Zielgewebe wie Fettgewebe, Leber und Skelettmuskulatur für Insulin erhöhen. Dabei kommt es durch verstärkte Glukoseaufnahme und verminderte endogene hepatische Glukoseproduktion zum einen zur Senkung des Blutzuckerspiegels. Zum anderen sinkt der Gehalt an freien Fettsäuren im Blut, da diese vermehrt von den Adipozyten aufgenommen und gespeichert werden. Dieser Effekt wird u. a. durch TNFalpha-antagonisierende Wirkungen der Thiazolidindione hervorgerufen (Day, 1999; Murase et al., 1998; Peraldi et al., 1997; Rosenbaum et al., 1998; Souza et al., 1998; Wajchenberg, 2007).

Die klinisch nachgewiesene verbesserte beta-Zellfunktion lässt sich nicht ausschließlich als sekundär bewirkte Folge einer reduzierten Insulinresistenz erklären. Thiazolidindione können auch unabhängig von dieser zur verbesserten beta-Zellfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 durch direkte Effekte an den Langerhans'schen Inseln führen (Ovalle et al., 2002; Ovalle et al., 2004; Wajchenberg, 2007). In pankreatischen alpha-Zellen führte die Stimulation mit Thiazolidindionen zu einer Hemmung der Glukagongentranskription und der Glukagonsekretion (Schinner et al., 2002). Im Einklang mit den klinisch beschriebenen erniedrigten Nüchternplasmainsulin- und den reduzierten Proinsulinspiegeln unter Einwirkung von Thiazolidindionen in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Pfutzner et al., 2011; Walter et al., 2005) konnte auf molekularer Ebene eine Hemmung der Insulingentranskription unter Thiazolidindionen gezeigt werden (Schinner et al., 2009a).

Die zur Zeit verfügbaren Thiazolidindione (Rosiglitazon und Pioglitazon) spielen aber aufgrund der aktuellen Datenlage zu deren Nebenwirkungsprofil für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 keine Rolle mehr.

#### 1.2.5 Insulin

Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zur Aktivierung komplexer Signalkaskaden. In Kürze dargestellt kommt es zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten auf der intrazellulären Rezeptorseite. Dadurch wird die Phosphorylierung verschiedener Signalmediatoren ermöglicht, unter denen die Insulinrezeptorsubstrate eine wichtige Rolle spielen (Schinner et al., 2005). Es können drei Hauptsignalwege unterschieden werden. Der PI<sub>3</sub>K/PKB-Signalweg reguliert den Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran, die Protein- und die Glykogensynthese und die Inhibition der hepatischen Glukoneogenese. Der Cbl/CAP (Cbl-associated Protein) Signalweg führt zu einer PI<sub>3</sub>Kunabhängigen Translokation von Glukosetransportern in die Zellmembran. Der MAP-Kinase-Signalweg (Mitogen-activated Protein) ist bedeutsam im Hinblick auf die Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung (Avogaro et al., 2010). Zusätzlich sind zahlreiche intrazelluläre Signalmediatoren beschrieben worden, die unabhängig von IRS und PI<sub>3</sub>K wirken (Zeyda et al., 2009).

Die meisten Wirbeltierspezies, so auch der Mensch, weisen ein Insulingen in ihrem Genom auf (Owerbach et al., 1980). Die genomische DNA von Ratte und Maus besitzt dagegen zwei Insulingene (Insulin I und II) mit einer Homologie von über 90 %, welche etwa gleich stark exprimiert werden (Soares et al., 1985).

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass Insulin über den PI<sub>3</sub>K/PKB-Signalweg zur Phosphorylierung und damit Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta führt, einem wichtigen Regulator des kanonischen Wnt-Signalwegs (Desbois-Mouthon et al., 2001; Ding et al., 2000). In intestinalen Zellen konnte auf unterschiedlichen Ebenen eine Interaktion des Insulin- mit dem Wnt-Signalweg beschrieben werden. Stimulation mit Insulin führte einerseits zu einem erhöhtem Gehalt an nukleärem beta-Catenin und zur verstärkten Expression von Wnt-Zielgenen (Sun et al., 2008; Yi et al., 2008). Andererseits kam es in intestinalen Zellen unter Insulinstimulation zur verstärkten Expression des Wnt-Rezeptors Frizzled-4 und des Wnt-regulierten Transkriptionsfaktors TCF7L2,

welche selbst Komponenten des Wnt-Signalwegs darstellen (Sun et al., 2010). In GLP-1-produzierenden L-Zellen führte Insulin über Effektoren des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer verstärkten Expression von Proglukagon und einer erhöhten Produktion des Inkretinhormons (Yi et al., 2008).

## 1.3 Der Wnt-Signalweg

## 1.3.1 Forschungsursprung des Wnt-Signalwegs

Die Forschung über den Wnt-Signalweg begann in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts in den Bereichen der Entwicklungsbiologie und der Onkogenese. Es wurde herausgefunden, dass die Genprodukte des Wingless-Gens in Drosophila melanogaster und des Int-1-Gens der Maus (später Wnt1) zu einer großen, evolutionär hoch konservierten Familie von extrazellulären Signalmolekülen gehören (Rijsewijk et al., 1987). Int-1 wurde ursprünglich identifiziert als Onkogen, das nach seiner Aktivierung durch die provirale Insertion des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) in den Int-1 Lokus zur Bildung von Mammakarzinomen in der Maus führt (Nusse et al., 1982). Mutationen im Wingless-Gen von Drosophila melanogaster führten zu Mutationen der Flügel und Halteren (Schwingkölbchen) (Sharma et al., 1976).

Nach der gelungenen Isolierung des Genproduktes des Wingless-Gens von Drosophila melanogaster zeigte sich, dass Int-1 und Wingless identisch sind (Rijsewijk et al., 1987). Die Bezeichnung Wnt ist eine Kombination aus Wingless und Int-1.

## 1.3.2 Komponenten des Wnt-Signalwegs

Der kanonische Wnt-Signalweg besteht aus extrazellulären Rezeptorliganden, zellmembranständigen Rezeptoren, Korezeptoren und intrazellulären Signalkomponenten, unter denen beta-Catenin eine Schlüsselrolle spielt.

Wnt-Rezeptorliganden sind sezernierte Proteine, die posttranslational durch Glykosylierungen und Konjugation mit einer Palmitinsäurekette modifiziert werden (Mikels et al., 2006). Bei Säugetieren, so auch beim Menschen, sind insgesamt 19 verschiedene Wnt-Rezeptor-Liganden bekannt. Mittels phylogenetischer Analyse konnten diese in insgesamt zwölf Subfamilien eingeteilt werden. Davon bestanden elf Subfamilien bereits in der frühen Evolution der Metazoen vor ca. 650 Millionen Jahren. Dies lässt darauf schließen, dass die Wnt-Signalmoleküle evolutionär hoch konserviert und ihre Funktionen nicht redundant sind (van Amerongen et al., 2009).

Die ersten Untersuchungen zu den Effekten der Wnt-Liganden waren meist Gentransferexperimente in Zellkultursystemen und Tiermodellen. Diese Studien führten zur Einteilung der Wnt-Liganden in zwei Gruppen. Die Moleküle der einen Gruppe, wie z. B. Wnt1, waren in der Lage, bei Überexpression in Xenopus laevis (glatter Krallenfrosch) eine sekundäre dorsal-ventrale Achse auszubilden. Die Mitglieder der anderen Gruppe, wie z.B. Wnt5a, konnten dies nicht. Die Fähigkeit der Ausbildung dieser morphologischen Besonderheiten ging einher mit einem Anstieg der Menge an freiem beta-Catenin im Zytoplasma (van Amerongen et al., 2008), wohingegen Wnt5a Effekte zeigte, die völlig unabhängig von beta-Catenin zu sein schienen.

Auf diese Studien geht die Einteilung des Wnt-Signalwegs in den sogenannten kanonischen und die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege zurück. Unter kanonischen Wnt-Liganden versteht man seitdem solche, die ihre Effekte auf die Zielzelle durch Stabilisierung des beta-Catenin/TCF-Transkriptionsfaktor-Komplexes als Haupteffektor dieses Signalwegs ausüben. Da das beta-Catenin-Gen in zahlreichen Tumoren des Menschen Mutationen aufweist, galt das wissenschaftliche Interesse vor allem der Erkennung molekularer Mechanismen, durch welche die Aktivität von beta-Catenin kontrolliert werden kann. So lag der Fokus auf der Erforschung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Heutzutage weiß man jedoch, dass Wnt-Liganden nicht intrinsisch über den kanonischen oder die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege wirken, sondern die durch sie vermittelten Signalkaskaden von dem Angebot der Wnt-Rezeptoren auf den Zellmembranen abhängig sind (van Amerongen et al., 2009). Über die Wirkmechanismen der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege ist bisher nur wenig bekannt. Ihre Wirkungen werden über zahlreiche zelluläre Signalmoleküle vermittelt, z. B. durch die Aktivierung von Rho-GTPasen, c-Jun N-terminalen Kinasen und durch Kalzium-abhängige Signalwege (De, 2011; van Amerongen et al., 2009).

Zu den Wnt-Rezeptoren gehört die Familie der Frizzled-Rezeptoren. Dies sind Rezeptoren mit einer sieben-transmembranösen Domäne und einer extrazellulären Wnt-Bindungsstelle in Form einer Cystein-reichen Domäne (Bhanot et al., 1996). Es sind insgesamt zehn humane Frizzled-Rezeptoren bekannt (van Amerongen et al., 2009).

Als Korezeptoren sind die LRP-Rezeptoren 5 und 6 (Low-density Lipoprotein Receptorrelated Protein) entdeckt worden (Tamai et al., 2000). Dies sind Rezeptoren mit einer einfachen transmembranösen Domäne (Mao et al., 2001). Sie weisen im Verhältnis zum intrazellulären Teil eine wesentlich längere extrazelluläre Sequenz auf. Es wird angenommen, dass es bei Bindung eines Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor zur Komplexbildung mit einem der beiden LRP-Korezeptoren kommt, wodurch das Wnt-Signal transduziert wird (Mikels et al., 2006).

#### 1.3.3 Die Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs

Beta-Catenin spielt für die Regulation der Wnt-Signaltransduktion eine maßgebende Rolle. Ohne Bindung eines aktivierenden Wnt-Liganden an die Wnt-Rezeptoren wird das im Zytoplasma vorliegende beta-Catenin durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3beta (GSK-3 $\beta$ ) konstitutiv phosphoryliert. Diese ist Teil des sogenannten *destruction complex*, zu dem u. a. auch die Casein-Kinase-1-alpha (CK-1 $\alpha$ ), Axin und das APC-Protein (Adenomatous Polyposis Coli Protein) gehören. Die Phosphorylierung von beta-Catenin führt zu seiner Ubiquitin-vermittelten Degradation durch Proteasomen im Zytoplasma, sodass die Konzentration von beta-Catenin im Zytoplasma gering gehalten wird (vgl. Abb. 1.3.1 a)

Die Bindung eines Wnt-Liganden (Wnt) an den Wnt-Rezeptorkomplex, bestehend aus einem Frizzled-Rezeptor und einem der beiden Korezeptoren LRP5 oder LRP6, führt zur Aktivierung des Signalwegs. Hierbei kommt es über eine intrazelluläre Signalvermittlung, die bisher im Detail noch nicht vollständig geklärt ist, zur Hemmung des destruction complex. Die Proteine Dishevelled und Axin sollen hierbei eine wichtige Rolle spielen. So bindet Axin bei Aktivierung des Signalwegs an eine zuvor phosphorylierte Sequenz innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von LRP5 (Mikels et al., 2006). Es wird vermutet, dass dies zur Auflösung des destruction complex beiträgt, wodurch er inaktiviert wird. Dadurch kann beta-Catenin nun nicht mehr durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3beta phosphoryliert werden, sondern akkumuliert im Zytoplasma und transloziert in den Nukleus. Dort bindet es u. a. an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Es gibt vier Mitglieder der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (T cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor). Diese sind TCF-1 (bzw. TCF-7), LEF-1, TCF-3 (bzw. TCF7L1) und TCF-4 (bzw. TCF7L2). Jeder dieser Transkriptionsfaktoren bildet zusammen mit dem Transkriptionsrepressor Groucho und Histondeacetylasen in Abwesenheit von beta-Catenin einen transkriptionsreprimierenden Komplex durch Bindung an die Konsensussequenz CTTTG[A/T][A/T] der Wnt-ZielgenPromotoren. Das in den Zellkern translozierte beta-Catenin verdrängt Groucho aus dieser Bindung, wodurch es zur Konvertierung des Signals in ein transkriptionsaktivierendes Signal kommt (Jin, 2008). Es folgt die Expression von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs (Gordon et al., 2006), von denen mittlerweile zahlreiche bekannt geworden sind, z. B. die Zellzyklusregulatoren c-Myc und Zyklin D1 (Schinner et al., 2008) (vgl. Abb. 1.3.1 b).



Abb. 1.3.1 Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegsa) Ohne Bindung eines Wnt-Liganden am Wnt-Rezeptor kommt es zur konstitutiven Degradation von beta-Catenin im Zytoplasma.

**b)** Die Bindung eines Wnt-Liganden führt zur Hemmung des *destruction complex* (vgl. Kap. 1.3.3), wodurch es zur beta-Catenin/TCF-vermittelten Wnt-Zielgentranskription kommt.

# 1.3.4 Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs für die pankreatische beta-Zelle

Der kanonische Wnt-Signalweg ist von Bedeutung für die pankreatische beta-Zelle. Humangenetische Studien lenkten schon 2004 die Aufmerksamkeit in der Diabetesforschung auf den Wnt-Signalweg. In einer japanischen Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass Mutationen innerhalb des für den Wnt-Liganden Wnt5b kodierenden Gens eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 zeigen (Kanazawa et al., 2004). Erneute Aufmerksamkeit wurde dem Wnt-Signalweg zuteil, als 2006 in einer sogenannten genomweiten Assoziationsstudie durch Grant et al. gezeigt wurde, dass bestimmte Polymorphismen einzelner Nukleotide in den Intronregionen des für den Transkriptionsfaktor TCF7L2 kodierenden Gens mit dem bisher bekannten größten Risiko einhergehen, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (Grant et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass heterozygote und homozygote Träger der Risikoallele ein relatives Risiko für die Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 von 1,45 bzw. 2,41 verglichen mit Nichtträgern der Risikoallele haben. Dies führt bei einer Prävalenz der Heterozygoten von ca. 38 % und der Homozygoten von ca. 7 % zu einem Populationsattributablen Risiko von 21 %. Verglichen mit anderen Diabetes-assoziierten Genen, wie z. B. Mutationen im KCNJ11- oder PPAR-gamma-Gen, zeigten die Polymorphismen innerhalb der TCF7L2-Genregion mit einer Odds Ratio pro vererbtem Risikoallel zwischen 1,31 und 1,43 die bisher bekannte stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Diabetes mellitus (Frayling, 2007).

Florez et al. bestätigten in einer Studie innerhalb des Diabetes Prevention Program an Teilnehmern mit verminderter Glukosetoleranz, dass die Progression zum manifesten Diabetes mellitus Typ 2 positiv assoziiert mit bestimmten Polymorphismen innerhalb von TCF7L2 ist (Florez et al., 2006). Diese Assoziation der entdeckten Polymorphismen wurde durch mehrere genomweite Assoziationsstudien (Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Zeggini et al., 2007) und zahlreiche Studien an verschiedenen ethnischen Gruppen bestätigt (Chang et al., 2007; Damcott et al., 2006; Hayashi et al., 2007; Horikoshi et al., 2007; Lehman et al., 2007; Marzi et al., 2007; Sale et al., 2007; Chandak et al., 2007). Bisher ist noch nicht geklärt, wie diese Polymorphismen, die innerhalb der Intronregionen des TCF7L2-Gens lokalisiert sind, zu der Entwicklung des Diabetes beitragen.

Zunächst wurde eine veränderte GLP-1-Sekretion und damit ein verminderter Inkretineffekt bei den Risikoallelträgern vermutet, da die Proglukagonexpression und die GLP-1-Biosynthese in intestinalen L-Zellen durch den kanonischen beta-Catenin/TCF7L2-Transkriptionskomplex reguliert werden (Yi et al., 2005). Diese Vermutung ließ sich jedoch nicht bestätigen, denn während der Durchführung von oralen Glukosetoleranztests wurden keine Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von GLP-1 zwischen gesunden Risikoallelträgern und -nichtträgern gefunden (Lyssenko, 2008; Pilgaard et al., 2009; Schafer et al., 2007; Villareal et al., 2010). Dagegen zeigte sich die GLP-1induzierte Insulinsekretion bei Risikoallelträgern reduziert (Pilgaard et al., 2009; Schafer et al., 2007). *In vitro* Versuche ergaben, dass in Langerhans'schen Inseln von Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 und von Nagern mit diabetischer Stoffwechsellage die Expression von TCF7L2 auf mRNA-Ebene zwar erhöht, auf Proteinebene jedoch vermindert ist (Lyssenko, 2008; Shu et al., 2009). Ein Knockdown von TCF7L2 durch spezifische siRNA in isolierten murinen und humanen Inseln führte zu einer verminderten Glukose-stimulierten Insulinsekretion (Shu et al., 2008). Ferner zeigte sich eine verminderte Expression von Genen, die an der Fusion der insulinsekretorischen Granula mit der Zellmembran beteiligt sind, worin eine gestörte Insulin-Exozytose begründet wurde (da Silva Xavier G et al., 2009). Zusätzlich kam es unter einem Knockdown von TCF7L2 zu einer verminderten Expression des GLP-1-Rezeptors, was mit einem vollständigen Verlust der GLP-1-vermittelten Glukose-induzierten Insulinsekretion einherging (Shu et al., 2009). In der Zusammenschau scheint daher nicht eine veränderte Sekretion von GLP-1, sondern eine verminderte GLP-1-Responsivität der beta-Zelle durch die Polymorphismen innerhalb von TCF7L2 wahrscheinlich (Mussig et al., 2010; Schinner et al., 2009b).

In verschiedenen Studien konnte bereits sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Heller et al., 2002; Heller et al., 2003; Lee et al., 2008; Papadopoulou et al., 2005) gezeigt werden, dass wichtige Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen exprimiert werden, was auf seine Bedeutung für die beta-Zellphysiologie hinweist. Ein intakter Wnt-Signalweg ist von großer Bedeutung für die Insulinsekretion der beta-Zellen (Jin, 2008; Schinner et al., 2009b). Fujino et al. demonstrierten, dass adulte LRP5-Knockout-Mäuse im Alter von sechs Monaten bei Durchführung eines intraperitonealen Glukosetoleranztests eine verminderte Glukosetoleranz unter Ausschluss einer Insulinresistenz zeigten (Fujino et al., 2003). Bezüglich des Pankreasgewichts, des pankreatischen Insulingehalts und der Inselarchitektur wiesen die LRP5-Knockout-Mäuse keine Veränderungen auf. Auch in vitro zeigten die isolierten Inseln der Knockout-Mäuse eine verminderte Glukose-stimulierte Insulinsekretion, welche auf ein gestörtes Glukosesensing der beta-Zelle zurückgeführt wurde. Die Stimulation von Wildtyp-Inseln mit den Wnt-Rezeptorliganden Wnt3a und Wnt5a führte zu einer verstärkten Glukose-stimulierten Insulinsekretion. Dies konnte in LRP5-Knockout-Inseln unter Wnt3a-Stimulation nur dann erreicht werden, wenn diese mit einem rekombinanten, für den humanen LRP5-Rezeptor kodierenden Adenovirus infiziert worden waren.

Ein Knockdown des wichtigen Transkriptionsfaktors TCF7L2 durch siRNA führte in isolierten murinen und humanen Inseln ebenfalls zu einer verminderten Glukosestimulierten Insulinsekretion und zu einem reduziertem Effekt von GLP-1 auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (Shu et al., 2008).

Adipozyten exprimieren Wnt-Signalmoleküle, so z. B. die Wnt-Liganden Wnt10b und Wnt3a, über welche para- und endokrine Effekte vermittelt werden (Schinner et al., 2007). Ein mit humanen Adipozyten konditioniertes Zellkulturmedium führte in diesem Zusammenhang zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in kultivierten INS-1 beta-Zellen. Die Insulinsekretion isolierter primärer muriner Inseln konnte Wnt-Signalvermittelt durch Adipozyten-konditioniertes Medium erhöht werden und die Stimulation mit Wnt3a führte zu einer verstärkten Expression der für das Glukosesensing wichtigen Glukokinase. Da beta-Catenin die Aktivität des Glukokinasegens in beta-Zellen steigerte, wurde das Glukokinasegen als neues Zielgen des Wnt-Signalwegs entdeckt (Schinner et al., 2008). Dies erhärtet den Verdacht in Zusammenschau der Ergebnisse von Fujino et al., dass es unter Wnt-Signalaktivierung zu einer erhöhten Insulinsekretion durch verbessertes Glukosesensing in pankreatischen beta-Zellen kommt (Schinner et al., 2009b; Welters et al., 2008).

Doch nicht nur für die Insulinsekretion scheint der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen, sondern er stellt sich auch als Regulator des Zellzyklus und der Proliferation der beta-Zellen dar. Rulifson et al. zeigten, dass rekombinantes Wnt3a die Expression wichtiger beta-Zellzyklusregulatoren wie Zyklin D2 und Pitx2 in isolierten murinen und humanen Inseln und in pankreatischen beta-Zellen einer murinen beta-Zelllinie induzierte, was mit einer erhöhten Proliferationsrate einherging. Die spezifische Überexpression von beta-Catenin in insulinproduzierenden beta-Zellen führte bei transgenen Mäusen im Alter von drei Monaten zu einer verstärkten Expression von Proliferationsmarkern und einer vermehrten beta-Zellmasse. Umgekehrt fand sich unter Überexpression des Wnt-Inhibitors Axin eine um 60 % reduzierte postnatale beta-Zellexpansion im Vergleich zu Kontrollmäusen (Rulifson et al., 2007).

Der Knockdown von TCF7L2 in isolierten humanen Inselzellen führte nicht nur zu einer verminderten Insulinsekretion, sondern auch zu einer verminderten Proliferationsrate und einer erhöhten Apoptoserate. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von TCF7L2 in Inselzellen zu einem zellulären Schutz vor Glukotoxizität und Zytokin-

vermittelter Toxizität im Bezug auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion, Proliferation und Apoptose (Shu et al., 2008).

Das mit humanen Adipozyten konditionierte Zellkulturmedium führte neben der Insulinsekretionssteigerung auch zu einer Wnt-vermittelten Steigerung der Proliferation von INS-1 beta-Zellen und primären beta-Zellen von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Im Einklang damit führte eine Behandlung von INS-1 beta-Zellen mit Adipozyten-konditioniertem Medium zu einer verstärkten Aktivität des Zyklin D1-Promotors (Schinner et al., 2008).

Es wurde bereits erkannt, dass der Wnt-Signalweg nicht nur durch die Wnt-Liganden aktiviert werden kann, sondern auch durch andere physiologische Stimuli, wie z. B. Insulin (Yi et al., 2008) und das Inkretinhormon GLP-1 (Liu et al., 2008). Anhand von TCF-Reportergen-Assays identifizierten Liu und Habener GLP-1 und das langwirksame GLP-1-Analogon Exendin-4 als Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen INS-1 beta-Zellen und isolierten primären Inseln der Maus. Die Stimulation von INS-1 beta-Zellen mit Exendin-4 führte zu einer verstärkten Proliferation und Expression der Zellzyklusregulatoren und bekannten Wnt-Zielgene Zyklin D1 und c-Myc. Eine Chromatin-Immunopräzipitation unter Exendin-4-Stimulation zeigte im Einklang damit eine verstärkte Interaktion von beta-Catenin und TCF7L2 mit dem Zyklin D1-Promotor. Die Hemmung von TCF7L2 sowohl durch die stabile Transfektion mit einer dominant-negativen Mutante von TCF7L2 (dn-TCF7L2) als auch die transiente Infektion mit einem dn-TCF7L2-Retrovirus in INS-1 beta-Zellen und primären murinen Inseln führte zu einer verminderten basalen Proliferationsrate und verhinderte den fördernden Effekt von Exendin-4 auf die beta-Zellproliferation. Ein hiermit vergleichbares Ergebnis wurde durch den Knockdown von beta-Catenin erzielt. Hierdurch wird deutlich, dass sowohl die basale als auch die Exendin-4-vermittelte Proliferation von beta-Zellen einen intakten beta-Catenin/TCF7L2-regulierten Wnt-Signalweg benötigen (Liu et al., 2008).

Ist die Relevanz des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Physiologie der adulten beta-Zelle schon in zahlreichen Studien deutlich geworden, gibt es noch einige Unklarheiten seine Bedeutung für die pränatale beta-Zelle betreffend (Welters et al., 2008). Es besteht bereits Konsens darüber, dass zu Beginn der Pankreasentwicklung eine Inhibition des Wnt-Signalwegs notwendig für die Spezifikation von pankreasspezifischen Zellen aus dem Endoderm ist (Heller et al., 2002; McLin et al., 2007; Murtaugh, 2008). Studien zur Bedeutung der Wnt-Aktivität zu einem späteren pränatalen Entwicklungsstadium zeigen allerdings bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse. Einerseits wurde gezeigt, dass eine Inhibition der kanonischen Wnt-Signalaktivität in dem sich entwickelnden Pankreas nicht zu einer Störung von Entwicklung und Funktion der endokrinen Pankreasfraktion führte (Papadopoulou et al., 2005). Andererseits ergaben die Ergebnisse von Dabernat et al., dass eine fehlende beta-Catenin-Expression in pränatalen pankreatischen beta-Zellen starke Defekte der Entwicklung des endokrinen Pankreas zur Folge hatte (Dabernat et al., 2009). Auch wenn die Ergebnisse zunächst nicht unmittelbar in Einklang miteinander zu bringen sind, wird durch sie die Komplexität des kanonischen Wnt-Signalwegs in der pankreatischen beta-Zelle deutlich. Es scheint, dass der genaue Zeitpunkt der Wnt-Signalinaktivierung von großer Bedeutung für die ungestörte Entwicklung der beta-Zelle ist (Murtaugh, 2008).

Auch für die adulte beta-Zellen gibt es Studienergebnisse, die auf eine komplexe Regulation der beta-Zellfunktion durch den kanonischen Wnt-Signalweg hinweisen. Grapin-Botton et al. konnten mit Hilfe eines Wnt-spezifischen Reportergens eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der prä- und perinatalen insulinproduzierenden Inselzelle nachweisen. Diese war jedoch in den beta-Zellen von sechs Wochen alten Mäusepankreata nicht mehr detektierbar (Dessimoz et al., 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass in pankreatischen Inseln eines Mausmodells zur Adipositas und Insulinresistenz, der sogenannten ob/ob-Maus, die Expression des Wnt-Liganden Wnt4 im Vergleich zu etwa neun Wochen alten Wildtyp-Mäusen verstärkt war. Gleichzeitig konnte weder in den Wildtyp-Mäusen noch in dem insulinresistenten Mausmodell eine endogene Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs mit Hilfe eines Reportertransgens in den Langerhans'schen Inseln gefunden werden. Wnt4 wurde als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs in beta-Zellen identifiziert (Krutzfeldt et al., 2010).

Trotz der bereits zahlreich durchgeführten Studien zum Wnt-Signalweg in pankreatischen beta-Zellen gibt es noch wichtige unbeantwortete Fragen. Die Expression wichtiger Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen unterstreicht dessen Relevanz für die beta-Zellphysiologie. Jedoch ist bisher die Regulation der Expression von endogenen Wnt-Signalmolekülen in beta-Zellen unbekannt. Die verstärkte Expression von Wnt4 unter Insulinresistenz in Zusammenhang mit seiner antagonisierenden Wirkung auf die Wnt-Signalaktivität in adulten beta-Zellen, lässt weitere Fragen zu seiner Rolle für die beta-Zellphysiologie aufkommen.

#### 1.4 Ziel der Arbeit

Pankreatische beta-Zellen haben die Fähigkeit, sich wechselnden metabolischen Gegebenheiten anzupassen. Beim Auftreten einer Insulinresistenz wird durch eine kompensierende Hyperinsulinämie ein normoglykämischer Zustand aufrechterhalten (Guillausseau et al., 2003; Weir et al., 2001). Häufig kommt es im weiteren Verlauf aufgrund einer beta-Zelldysfunktion zur Entwicklung eines manifesten Diabetes mellitus Typ 2. Die Mechanismen, die zur Adaptation der beta-Zellen an die veränderten metabolischen Anforderungen und zum beta-Zelluntergang führen, sind im Detail noch nicht geklärt.

Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass bestimmte Polymorphismen innerhalb des TCF7L2-Gens die bisher bekannte stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 aufweisen (Florez et al., 2006; Frayling, 2007; Grant et al., 2006) und machten eine wichtige Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Regulation wesentlicher beta-Zellfunktionen deutlich. Zudem wurde erkannt, dass Exendin-4, ein Analogon des intestinalen Glucagon-like Peptide-1, einen Teil seiner proliferativen Wirkung auf die beta-Zelle über den kanonischen Wnt-Signalweg ausübt (Liu et al., 2008).

Wichtige Komponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs werden in pankreatischen Langerhans'schen Inseln exprimiert (Heller et al., 2002; Heller et al., 2003; Lee et al., 2008). Die Expression des Wnt-Rezeptorliganden Wnt4 ist in pankreatischen Inseln insulinresistenter Mausmodelle verstärkt (Krutzfeldt et al., 2010). Die physiologische Bedeutung dessen ist bisher unklar. Die Regulation von Wnt-Signalmolekülen durch pharmakologische und metabolische Stimuli in beta-Zellen ist weitestgehend unbekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung verschiedener Antidiabetika und verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Expression der endogenen Wnt-Signalmoleküle Wnt4, Wnt10b, LRP5, Frizzled-4 und TCF7L2 in der beta-Zelllinie INS-1 und in primären pankreatischen Langerhans'schen Inseln der Maus analysiert und Untersuchungen zur Funktion von Wnt4 für die beta-Zelle durchgeführt.

Diese Arbeit soll dazu dienen, einen Einblick in die Regulation der Expression von endogenen Wnt-Signalmoleküle durch pharmakologische und metabolische Stimuli zu erlangen und das Verständnis für deren physiologische Bedeutung in pankreatischen beta-Zellen zu erweitern. Diese grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse könnten zur weiteren Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen.
# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## 2.1.1 Reagenzien

Substanz	Firma
[methyl-H3] Thymidine	Hartmann Analytic (Braunschweig)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acrylamide (30 %)/ Bis Solution, 37, 5:1	Bio-Rad (München)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Antikörper:	
Anti-beta-Aktin-Antikörper	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-Wnt-4-Antikörper	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-
	Nordenstadt)
<ul> <li>Rabbit polyclonal to Goat IgG (HRP)</li> </ul>	Abcam (Cambridge, UK)
Rabbit polyclonal to Mouse IgG (HRP)	Abcam (Cambridge, UK)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aqua destillata	Otto Fischar GmbH & Co. KG (Saar-
	brücken-Scheidt)
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Waltham, Massachu-
	setts, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
CelLytic™m Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Entwickler	Agfa Healthcare NV (Mortsel, Belgien)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Exendin-4	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fixierer	Agfa Healthcare NV (Mortsel, Belgien)
Gene Ruler <sup>™</sup> Ultra Low Range DNA	Thermo Scientific (Waltham, Massachu-
Ladder	setts, USA)

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ethansulfonsäure)	
HiPerFect-Transfektionsreagenz	Qiagen GmbH (Hilden)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin-RIA Kit	Millipore Corporation (Billerica, Massa-
	chusetts, USA)
Kälberserum, fetales (FKS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad (München)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kollagenase (Collagenase NB 8 Broad	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Range)	
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Metformin (1,1-Dimethylbiguanid Hydro-	Sigma-Aldrich (Steinheim)
chlorid)	
Methanol	Merck (Darmstadt)
Nanofectamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Nonfat Dry Milk	Cell Signaling Technology (Danvers,
	Massachusetts, USA)
PCR-Primer:	

-	Rattus norvegicus:	
•	Cyclin D1 (Ccnd1)	Qiagen GmbH (Hilden)
•	Frizzled homolog 4 (Fzd4)	Qiagen GmbH (Hilden)
•	Low density lipoprotein receptor-	Qiagen GmbH (Hilden)
	related protein 5 (Lrp5)	
•	TATA box binding protein (TBP)	Qiagen GmbH (Hilden)
•	Transcription factor 7-like 2, T-cell	Qiagen GmbH (Hilden)
	specific (Tcf7l2)	
•	Wingless-type MMTV integration site	Qiagen GmbH (Hilden)
	family, member 10B (Wnt10b)	
•	Wingless-type MMTV integration site	Qiagen GmbH (Hilden)

2	ົ
2	U

family,	member	4 (Wnt4)
---------	--------	----------

Mus musculus:

<ul> <li>Actin, beta (Actb)</li> </ul>	Qiagen GmbH (Hilden)
<ul> <li>Ins2 (Insulin II)</li> </ul>	Qiagen GmbH (Hilden)
<ul> <li>Wingless-related MMTV integration</li> </ul>	Qiagen GmbH (Hilden)
site 4 (Wnt4)	
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000	Invitrogen (Darmstadt)
U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomy-	
cin)	
pRL-TK-Plasmid	Promega (Mannheim)
Restore Western blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Waltham,
	Massachusetts, USA)
Rosiglitazon	Enzo Life Sciences AG (Lausen,
	Schweiz)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
siRNA:	
<ul> <li>Rn_Wnt4_4 FlexiTube siRNA</li> </ul>	Qiagen GmbH (Hilden)
<ul> <li>Rn_Wnt4_5 FlexiTube siRNA</li> </ul>	Qiagen GmbH (Hilden)

- Rn\_Wnt4\_6 FlexiTube siRNA
- AllStars Negative Control siRNA
- Allstars Neg. siRNA AF 488
   Storage and Loading Buffer

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Szintillationscocktail (Betaplate Scint)

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) Tolbutamid Topflash-Plasmid

Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan Trypanblaulösung (0,4 %) Qiagen GmbH (Hilden) Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) Sigma-Aldrich (Steinheim)

Sigma-Aldrich (Steinheim) Upstate Cell Signaling Solutions (Charlottesville, Virginia, USA) Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) Sigma-Aldrich (Steinheim)

Trypsin (5 %-Trypsin-EDTA)	Invitrogen (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wnt3a, rekombinant	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-
	Nordenstadt)
Wnt4, rekombinant	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-
	Nordenstadt)

### 2.1.2 Medien

Medium	Firma
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Me- dium)	Invitrogen (Darmstadt)
HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)	Pan Biotech (Aidenbach)
RPMI-Medium 1640 [-] (D)-Glukose	Invitrogen (Darmstadt)
RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX™-I	Invitrogen (Darmstadt)
Modifiziertes Medium	Zusammensetzung
HBSS mit FKS	HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)
	10 % fetales Kälberserum
	1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung
RPMI-Medium (Basal-Medium)	RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX™-I mit
	11 mM Glukosekonzentration
	10 % fetales Kälberserum
	1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung
RPMI-Medium (Hochglukose)	RPMI-Medium 1640 [-] (D)-Glukose
	16,7 mM Glukose
	10 % fetales Kälberserum
	1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung
RPMI-Medium (Niedrigglukose)	RPMI-Medium 1640 [-] (D)-Glukose
	5,5 mM Glukose
	10 % fetales Kälberserum
	1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung

# 2.1.3 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
APS-Lösung (10 %)	100 g/l Ammoniumpersulfat
Blockpuffer/Antikörperverdünnungslösung	5.0 g Nonfat Dry Milk/100 ml TBST-
	Puffer
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered	Invitrogen (Darmstadt)
Saline)	
Elektrodenpuffer (1 I)	2,9 g Glycin
	5,8 g Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
	3,7 ml 10 % SDS
	200 ml Methanol
	Aqua dest.
Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	154 mM Natriumchlorid
	154 mM Kaliumchlorid
	154 mM Magnesiumsulfat
	100 mM Natriumdihydrogenphosphat
	100 mM Kalziumchlorid
	10 mM HEPES
Probenpuffer (Western Blot)	1,25 ml 0,5 M Tris-Puffer
	2,5 ml Glycerol
	2 ml 10 % SDS
	0,2 ml 0,5 % Bromphenolbau
	3,55 ml Aqua dest.
SDS-Laufpuffer (pH 8,3; 10-fach; 1 I)	30,3 g Tris-(Hydroxymethyl)-
	aminomethan
	144,0 g Glycin
	10,0 g SDS
	Aqua dest.
SDS-Lösung (10 %)	100 g/l Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
TBST-Puffer (pH 7,5; 10-fach; 0,5 l)	6,1 g Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
	4,5 g Natriumchlorid

	0,5 ml Tween <sup>®</sup> 20
	Aqua dest.
TE-Puffer	Promega (Mannheim)
Tris-Puffer (pH 6,8; 0,5 M; 0,1 I)	6,0 g Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
	Aqua dest.
Tris-Puffer (pH 8,8; 1,5 M; 0,1 I)	18,0 g Tris-(Hydroxymethyl)-
	aminomethan
	Aqua dest.

## 2.1.4 Gele

Gel	Zusammensetzung
Agarosegel (1,5 %)	1,5 g Agarose
	100 ml TAE-Puffer
Sammelgel (5 %)	0,51 ml 30 % Acrylamid
	0,75 ml 0,5 M Tris-Puffer
	30 µl 10 % SDS
	13 µl 10 % APS
	3 µl TEMED
	1,7 ml Aqua dest.
Trenngel (12 %)	4,0 ml 30 % Acrylamid
	2,5 ml 1,5 M Tris-Puffer
	0,1 ml 10 % SDS
	0,1 ml 10 % APS
	4,0 ml TEMED
	3,3 ml Aqua dest.

## 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-Platte mit Glasfaserfiltern (UniFil-	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts,
ter®-96, GF/C®)	USA)

96-Well-Platten, flat-bottom, untreated	Nunc (Wiesbaden)	
Abdeckfolien (Sealing Tape)	Nunc (Wiesbaden)	
Amersham Hyperfilm™ ECL (High per-	GE-Healthcare (Amersham, Bucking-	
formance chemiluminescence film)	hamshire, UK)	
Filterpapier	Bio-Rad (München)	
Kryo-Röhrchen	Nunc (Wiesbaden)	
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Foster City, Kali-	
(0,1 ml)	fornien, USA)	
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Foster City, Kali-	
	fornien, USA)	
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)	
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Dassel)	
Pasteurpipetten (steril)	Ratiolab GmbH (Dreieich)	
PCR Tubes (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch	
	Oldendorf)	
Pipettenspitzen:		
- mit Filter:		
• Extended Length Filter Tips (101-1000	Starlab (Ahrensburg)	
μl)		
<ul> <li>Bevelled Filter Tips (1-100 µl)</li> </ul>	Starlab (Ahrensburg)	
<ul> <li>Filter Tips (0,1-10 µl)</li> </ul>	Starlab (Ahrensburg)	
<ul> <li>Natural Filter Tips (10 µl XL)</li> </ul>	Starlab (Ahrensburg)	
- ohne Filter:		
Natural Graduated Pipette Tips (101-	Starlab (Ahrensburg)	
1000 µl)		
<ul> <li>Natural Bevelled Filter Tips (1-200 µl)</li> </ul>	Starlab (Ahrensburg)	
• Extended Length, Natural Tips (0,1-10	Starlab (Ahrensburg)	
μl)		
Polystyrol-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)	
QIAshredder	Qiagen GmbH (Hilden)	
QIAshredder™	Qiagen GmbH (Hilden)	
Reaktionsgefäße (1,6 ml, steril)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch	
	Oldendorf)	
RNeasy® Plus Micro Kit	Qiagen GmbH (Hilden)	

RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Sterile Polypropylen-(PP)-Röhrchen (15,	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
50 ml)	
Stripetten (5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated Costar (Corning,
	New York, USA)
UVetten®	Eppendorf (Hamburg)
Zellkulturflaschen (50, 250 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturplatten:	
6-Well-Platte	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
• 24-Well-Platte	Nunc (Wiesbaden)
<ul> <li>96-Well-Platte, F(lat)- bottom</li> </ul>	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
<ul> <li>96-Well-Platte, round bottom</li> </ul>	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturschalen (Ultra-Low-Attachment)	Corning Incorporated Costar (Corning,
	New York, USA)
Zellschaber (Dispenser)	TPP-Tissue Culture and Laboratory
	Technology (Trasadingen, Schweiz)

## 2.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
DiaDhatamatar	Ennenderf (Hemburg)
BIOPHOLOMELEI	Eppendon (Hamburg)
+ DPU414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc. (Neu-Isenburg)
Brutschrank BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Gammazähler LB2111	Berthold (Bad Wildbad)
GelDoc	Bio-Rad (München)
Luminometer (Lumat LB9507)	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
MicroBeta FilterMate-96 Harvester	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts,
	USA)
Microplate Reader (Sunrise Remote Con-	Tecan Austria GmbH (Grödig/Salzburg,
trol)	Österreich)
+ Software Magellan Standard V 4.00	
Real-time PCR-Gerät	Applied Biosystems (Foster City, Kali-
(StepOnePlus™Real-Time PCR System)	fornien, USA)

Notebook inclusive StepOne™-Software	Dell (Round Rock, Texas, USA)
v2.0.1	
Schüttler (Shaker AGT 50)	Rettberg (Göttingen)
Sicherheitswerkbank (Hera Safe)	Heraeus (Hanau)
Szintillationszähler (1450 MicroBeta	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts,
Trilux, Liquid scintillation and lumines-	USA)
cence counter)	
Thermocycler	Biometra - Biomedizinische Analytik
	GmbH (Göttingen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Trans Blot® SD, Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)
UV-Lichtkammer	Bio-Rad (München)
Vortexer (Type REAX 1)	Heidolph (Kelheim)
Western Blot System (Mini-Protean® 3	Bio-Rad (München)
Cell)	
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
<ul> <li>Zentrifuge universal 30RF</li> </ul>	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Allgemeine Zellkultur

In der Zellkultur wurden INS-1 beta-Zellen verwendet. Diese sind Zellen einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie, die aus einem transplantierten, Röntgenstrahlen-induzierten Tumor entwickelt wurde (Asfari et al., 1992). INS-1 beta-Zellen sind stabile, hoch differenzierte beta-Zellen und stellen ein gutes Modell dar, um in vitro Funktionen von beta-Zellen zu untersuchen. Sämtliche Arbeitsschritte mit den Zellen wurden unter einer Sterilbank (Hera Safe, Heraeus Instruments, Hanau) durchgeführt. Die INS-1 beta-Zellen wurden im Brutschrank (BBD 6220, Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und bei einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Verwendet wurden dabei 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen), die mit 20 ml RPMI-Medium 1640 (Invitrogen, Darmstadt) gefüllt wurden. Dieses wurde versetzt mit 10 % FKS (Fetales Kälberserum, Sigma Aldrich, Steinheim), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Darmstadt). Zwei Mal in der Woche wurden die INS-1 beta-Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium mit einer Pipette (Stripetten, Morning Incorporated Costar, Morning, New York) abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 2,5 ml Trypsin (Invitrogen, Darmstadt) für drei Minuten vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellen wurden dann mit 7,5 ml des oben genannten FKS-haltigen Mediums mit Hilfe steriler Pipettenspitzen (Starlab, Ahrensburg) in ein steriles 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (Zentrifuge universal 30RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) wurde das Medium vom Zellpellet entfernt. Für die weitere Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen je nach Zelldichte im Verhältnis 1:2 bis 1:6 ausgesät, maximal jedoch bis zur 25. Passage.

Für die Stimulationsversuche in den 6-, 24- und 96-Well-Platten wurden die INS-1 beta-Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) ausgezählt und im entsprechenden Volumen ausgesät. Die vereinzelten abgestorbenen Zellen, die durch vorheriges Mischen mit Trypanblaulösung (Sigma Aldrich, Steinheim) angefärbt waren, wurden beim Auszählen nicht miteinbezogen.

Zur Langzeitkonservierung der Zellen wurden je 2 × 10<sup>6</sup> Zellen in RPMI-Medium gelöst. Die gelösten Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2 mit Einfriermedium gemischt und in ein Kryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Das Einfriermedium enthielt DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) und FKS im Verhältnis 1:5. Die Zellen wurden danach in Flüssigstickstoff bei - 196 °C eingefroren.

Zur Rekultivierung der INS-1 beta-Zellen wurde zunächst durch einen Waschschritt das im Einfriermedium enthaltene DMSO von den Zellen entfernt. Dazu wurden die Zellen in ein steriles 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 10 ml RPMI-Medium überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 8 ml RPMI-Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gelöst. Die Zellen wurden im Anschluss in eine 50 ml Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen in einer 250 ml Zellkulturflasche (Greiner Bio-One, Frickenhausen) weiterkultiviert.

#### 2.2.2 Stimulationen von INS-1 beta-Zellen

Für die Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit den verschiedenen Substanzen wurden stets 1×10<sup>6</sup> Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den adhärenten Zellen abgenommen und durch 2 ml RPMI-Medium ersetzt, welches die entsprechenden Stimulanzien enthielt. Die Stimulationsmedien wurden dabei immer frisch aus vorbereiteten Stocklösungen hergestellt. Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Stimulation der INS-1 beta-Zellen für 24 Stunden. Hieran schloss sich die Verarbeitung der Proben für PCR bzw. Western Blot an.

#### 2.2.2.1 Stimulation mit Antidiabetika

INS-1 beta-Zellen wurden mit den Antidiabetika Exendin-4 (Sigma-Aldrich, Steinheim), Insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim), Metformin (Sigma-Aldrich, Steinheim), Rosiglitazon (Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz) und Tolbutamid (Sigma-Aldrich, Steinheim) stimuliert. Mit Ausnahme von Insulin entsprachen die Konzentrationen den üblich eingesetzten Antidiabetikakonzentrationen in *in vitro* Versuchen. Die Konzentrationen an Insulin waren in etwa 5- bis 500-fach höher als die von INS-1 beta-Zellen in 24 Stunden sezernierte Insulinmenge, welche in Vorversuchen durch Insulin-Radioimmunoassays ermittelt worden war. Die Kontrollproben wurden mit 2 ml RPMI-Medium stimuliert, welche die entsprechenden Lösungsmittel der verschiedenen Stimulanzien enthielten. Dies waren DMSO als Lösungsmittel für Tolbutamid und Rosiglitazon und steriles Waser für Metformin, Insulin und Exendin-4. Einen Überblick über die verwendeten Antidiabetika und deren eingesetzte Konzentrationen gibt die folgende Tabelle (vgl. Tab. 2.2.1).

Antidiabetikum	Endkonzentrationen
Exendin-4	0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM <sup>1)</sup>
Insulin	0,1 µM, 1 µM, 10 µM
Metformin	10 μΜ, 50 μΜ, 500 μΜ <sup>2)</sup>
Rosiglitazon	0,1 μM, 10 μM, 50 μM <sup>3)</sup>
Tolbutamid	10 μΜ, 100 μΜ, 250 μΜ <sup>4)</sup>

Tab. 2.2.1 Verwendete Antidiabetika zur Stimulation von INS-1 beta-Zellen
Quellenangaben: <sup>1)</sup> Liu et al., 2008; Shu et al., 2008; Song et al., 2008; Yusta et al., 2006;
<sup>2)</sup> Irwin et al., 2010; Maida et al., 2011; Mannucci et al., 2001; McKiney et al., 2010; Pan et al., 2009; <sup>3)</sup> Han et al., 2008; Schinner et al., 2002; Schinner et al., 2009a; Welters et al., 2004;
<sup>4)</sup> Hatlapatka et al., 2009; Larsson-Nyren et al., 2007; Silva et al., 2008

### 2.2.2.2 Stimulation mit Exendin-4 für unterschiedliche Stimulationsdauer

INS-1 beta-Zellen wurden für 10, 30 und 60 Minuten und 2, 3, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 10 nM Exendin-4 stimuliert und anschließend für PCR-Analysen weiter verwendet.

### 2.2.2.3 Stimulation mit Exendin-4 und Exendin-(9-39)

Für die Kostimulation mit Exendin-4 und Exendin-(9-39) (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden INS-1 beta-Zellen entweder mit 10 nM Exendin-4, mit 2 µM Exendin-(9-39) oder gleichzeitig mit Exendin und Exendin-(9-39) in den genannten Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert. Das Medium der Kontrollen wurde mit entsprechenden Volumina des Lösungsmittels Wasser angereichert.

2.2.2.4 Stimulation mit Exendin-4 und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Für die Stimulation mit Exendin-4 unter verschiedenen Glukosekonzentrationen wurden INS-1 beta-Zellen mit 10 nM Exendin-4 stimuliert. Die dazu verwendeten RPMI-Medien enthielten niedrige, mittlere und hohe Glukosekonzentrationen von 5,5 mM, 11 mM und 16,7 mM. Die Kontrollmedien enthielten die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen aber kein Exendin-4. Als Referenzproben für die Angabe der relativen Expressionen dienten die Zellen, die mit 11 mM Glukose enthaltendem RPMI-Medium ohne Exendin-4

stimuliert worden sind. Denn RPMI-Medium mit dieser Glukosekonzentration entspricht dem für gewöhnlich verwendeten Kulturmedium für INS-1 beta-Zellen.

#### 2.2.2.5 Langzeitstimulation mit Exendin-4

Für die Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit Exendin-4 über einen Zeitraum von vier Wochen wurden je 1×10<sup>6</sup> Zellen in eine 50 ml Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 8 ml RPMI-Medium ersetzt, welches entweder Exendin-4 in einer Konzentration von 10 nM enthielt oder bezüglich der Kontrollen mit dem entsprechenden Volumen an sterilem Wasser angereichert wurde. Alle zwei Tage wurden die Medien abgenommen und durch neue Stimulationsmedien ersetzt. Nach einer Woche wurde ein Drittel der Zellen für die Isolierung der RNA und anschließende PCR-Analysen verwendet. Für die weitere Kultivierung der Zellen wurden erneut 1×10<sup>6</sup> Zellen in 50 ml Zellkulturflaschen ausgesät und mit Exendin-4 bzw. Kontrollmedium stimuliert. Der Vorgang wurde jeweils im Abstand von sieben Tagen über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen wiederholt.

#### 2.2.2.6 Stimulation mit GLUTag-konditioniertem Medium

GLUTag-Zellen sind enteroendokrine L-Zellen einer stabilen immortalisierten Zelllinie mit murinem Ursprung. Diese L-Zellen sezernieren u. a. das Inkretinhormon GLP-1 (Brubaker et al., 1998; Drucker et al., 1992; Lee et al., 1992; Reimann et al., 2008). GLUTag-Zellen wurden über drei Tage in 20 ml Zellkulturmedium D-MEM (Invitrogen, Darmstadt) im Brutschrank (BBD 6220, Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und bei einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Das Medium wurde anschließend abgenommen, steril filtriert und zur Stimulation der INS-1 beta-Zellen verwendet. Als Kontrollmedien wurden RPMI-Medium und D-MEM-Medium benutzt, in welchen keine GLUTag-Zellen kultiviert worden waren. Die Medien enthielten zusätzlich entweder 2 µM des GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39) oder dessen Lösungsmittel Wasser in entsprechendem Volumen.

#### 2.2.2.7 Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen

INS-1 beta-Zellen wurden mit 2 ml RPMI-Medium mit den Glukosekonzentrationen 5,5 mM, 11 mM und 16,7 mM stimuliert. Als Referenzprobe zur Ermittlung der Expression

der Wnt-Signalmoleküle wurden hierbei die Proben verwendet, welche mit 11 mM Glukose stimuliert worden waren.

#### 2.2.2.8 Langzeitstimulation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

Für die chronische Stimulation der INS-1 beta-Zellen über einen Zeitraum von vier Wochen wurden je 1×10<sup>6</sup> Zellen in eine 50 ml Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 8 ml RPMI-Medium mit entweder 5,5 mM, 11 mM oder 16,7 mM Glukose ersetzt. Täglich wurde das Medium abgenommen und durch neues Stimulationsmedium ersetzt. Nach einer Woche wurde ein Drittel der Zellen für die Isolierung der RNA und anschließende PCR-Analysen verwendet. Für die weitere Kultivierung der Zellen wurden erneut 1×10<sup>6</sup> Zellen in 50 ml Zellkulturflaschen in den entsprechenden Glukosekonzentrationen von 5 mM, 11 mM und 16,7 mM ausgesät. Der Vorgang wurde jeweils im Abstand von sieben Tagen wiederholt.

### 2.2.3 Isolation der murinen pankreatischen Langerhans'schen Inseln

Zur Isolation der Langerhans'schen Inseln wurden Pankreata von Wildtyp-Mäusen der Linie C57BL/6 verwendet. Die Haltung und die Opferung der Mäuse geschahen gemäß den Prinzipien des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 31. Mai 2006. Die Mäuse wurden im Alter von drei Monaten durch langsames Anströmen von reinem Kohlenstoffdioxid getötet. Danach wurden sie einzeln auf einem Sezierbrett fixiert und das Abdomen mit 70 %-igem Ethanol (Merck, Darmstadt) getränkt. Die Leibeshöhle wurde mit einer Schere eröffnet. Das Zwerchfell wurde entlang des Rippenbogens aufgeschnitten und das Brustbein nach kranial verlagert. Die Leber wurde hochgeklappt, sodass der Gallengang frei lag. Die Gallengangspapille des Duodenums wurde mit einer kleinen Klemme verschlossen. Eine dünne Kanüle wurde in den Gallengang nahe seiner Aufzweigung im Bereich der Leberpforte eingeführt. 2 ml Kollagenase (Collagenase NB 8 Broad Range from Clostridium histolyticum, Serva Electrophoresis, Heidelberg) gelöst in HBSS (Pan Biotech GmbH, Aidenbach) wurden retrograd in den Pankreasgang injiziert.

Das Pankreas wurde aus seinem umgebenden Gewebe vorsichtig mit Schere und Pinzette herausgetrennt und in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde das Pankreas mit 1 ml der Kollagenaselösung bedeckt. Die Kollagenaseaktivität pro Maus betrug insgesamt ca. eine Wünsch-Unit. Das entsprach in etwa 0,8 mg der Kollagenase. Die Pankreata wurden nach der Isolation sofort auf Eis gestellt, damit die Kollagenase in ihrer Aktivität gehemmt wurde. Die Pankreata wurden im Anschluss für acht Minuten in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und dabei geschüttelt. Danach wurde jedes Pankreas mit einer sterilen Pasteurpipette (Ratiolab GmbH, Dreieich) auf Eis homogenisiert. 6 ml HBSS mit 10 % FKS wurden dann hinzugefügt. Durch die kühlen Temperaturen und das FKS wurde das pankreatische Gewebe vor einem weiteren Verdau durch die Kollagenase geschützt. Nachdem die Pankreata auf dem Vortexer (Heidolph, Kehlheim) geschüttelt worden waren, wurden sie bei 1.200 Umdrehungen pro Minute für zwei Minuten zentrifugiert. Das HBSS-Medium wurde abgenommen und durch frisches HBSS mit 10 % FKS ersetzt. Es schlossen sich erneutes Schütteln und Zentrifugieren an. Das HBSS-Medium wurde nochmals entfernt und durch RPMI-Medium 1640 mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin ausgetauscht.

Die Langerhans'schen Inseln waren durch die Kollagenaseaktivität aus dem übrigen exokrinen Gewebe herausgelöst worden und konnten nun unter einem Binokular (Zoom 2000, Leica, Wetzler) mit einer Pipette aufgenommen werden. Die Inseln wurden während ihrer Isolation aus den übrigen Geweberesten stetig auf Eis gekühlt und zunächst in einem sterilen 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gesammelt. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt, bevor die Inseln in Zellkulturschälchen (Ultra Low Culture Dish, Ultra-Low-Attachment, Morning Incorporated, Morning, New York, USA) in RPMI-Medium über Nacht im Zellkulturschrank untergebracht wurden. Am nächsten Tag wurden die Inseln ein letztes Mal von den Resten des exokrinen Gewebes mittels Pipettieren getrennt und in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer aufgenommen.

#### 2.2.4 Stimulation der murinen pankreatischen Langerhans'schen Inseln

Je 10 Inseln pro Well wurden in 100 µl des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers in eine 96-Well-Zellkulturplatte (F-bottom, Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Die Inseln dreier Wells wurden jeweils mit derselben Substanz behandelt.

#### 2.2.4.1 Stimulation mit Exendin-4

Die Stimulation mit Exendin-4 über 24 Stunden erfolgte in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit einer Glukosekonzentration von 5,5 mM. Die Konzentration von Exendin-4 betrug 10 nM.

#### 2.2.4.2 Stimulation mit Wnt4

Zur Untersuchung der Wirkung von Wnt4 auf die Insulinexpression und Insulinsekretion wurden die Inseln zunächst für eine Stunde in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit 2,75 mM Glukosekonzentration kultiviert. Dann wurde der Puffer abgenommen und durch 150 µl Krebs-Ringer-HEPES-Lösungen mit steigenden Glukosekonzentrationen (2,75 mM, 5,5 mM, 11 mM, 22 mM, 28 mM) ersetzt. Das rekombinante Wnt4-Protein (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt), welches in PBS mit 0,2 % Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst war, wurde pro Well in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Das entsprechende Volumen an PBS mit 0,2 % BSA wurde dem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer der Inseln der Kontrollgruppe beigefügt. Nach drei bzw. 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und dienten zur Bestimmung der Insulinkonzentration. Die Langerhans'schen Inseln wurden für die Analyse der Insulingen-expression mittels real-time PCR verwendet.

#### 2.2.5 RNA-Isolation

#### 2.2.5.1 RNA-Isolation aus INS-1 beta-Zellen

Die Isolation der RNA erfolgte gemäß der Anleitung aus dem Handbuch des RNeasy® Plus Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (Dispenser, TPP-Tissue Culture and Laboratory Technology, Trasadingen, Schweiz) vom Boden der 6-Well-Platte gelöst. Das Medium mit den darin befindlichen Zellen wurde mit einer Pipette in ein steriles Reaktionsgefäß (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) überführt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau) und das Medium danach mit einer Pipette abgenommen. Auf das Zellpellet wurden dann 350 µl des RLT-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben, der zuvor mit beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:100 versetzt worden war. RNasen wurden durch diese denaturierende Lösung inaktiviert. Nach Lösung des Zellpellets durch Resuspension im Puffer wurde das Gemisch in ein QIAshredder-Röhrchen (Qiagen GmbH, Hilden) gefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute, wodurch das Gemisch homogenisiert wurde.

Das Lysat wurde aufgenommen und zur Elimination von genomischer DNA auf eine spezielle gDNA-Eliminatorsäule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden. Das Eluat

wurde in einem Sammelröhrchen (Collection tube, Qiagen GmbH, Hilden) aufgefangen. Die gDNA-Eliminatorsäule wurde verworfen und zu dem Eluat wurden 350 µl 70 %-iges Ethanol (Merck, Darmstadt) gegeben, sodass optimale Bedingungen für die RNA geschaffen wurden, an die RNeasy®-Mini-Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) zu binden. Nach Resuspension wurde die Lösung in eine RNeasy®-Mini-Säule überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen pro Minute an. Das Lysat wurde verworfen. Die RNA, die nun an der RNeasy®-Mini-Säule fixiert war, wurde durch drei Waschschritte gereinigt. Zunächst wurden 700 µl des RW1-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) in die Säulen gefüllt und bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Sekunden zentrifugiert. Dann wurden 500 µl des RPE-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) hinzugegeben, nachdem das Lysat aus dem Waschschritt zuvor verworfen worden war.

Die anschließende Zentrifugation wurde erneut bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 15 Sekunden durchgeführt. Danach wurden nochmals 500 µl des RPE-Puffers auf die Säulen gegeben. Bei 10.000 Umdrehungen pro Minute erfolgte die Zentrifugation für zwei Minuten. Anschließend wurden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen gesteckt und eine erneute Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen für eine Minute angeschlossen. Die RNeasy®-Mini-Säule wurde dann in ein Reaktionsgefäß (Qiagen GmbH, Hilden) gesteckt und 40 µl des RNase-freien Wassers (Qiagen GmbH, Hilden) direkt auf die Membran der Säule pipettiert. Durch das Wasser wird die RNA aus der Membran der Säule herausgewaschen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen wurde das Eluat mit einer Pipette aufgenommen und erneut auf die Membran der RNeasy®-Mini-Säule pipettiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen für eine Minute. Die RNA-Konzentration wurde durch diesen Schritt erhöht. Die Säulen wurden danach verworfen und es schloss sich die Messung der Konzentration der sich nun im Reaktionsgefäß befindlichen isolierten RNA an.

#### 2.2.5.2 RNA-Isolation aus primären murinen Langerhans'schen Inseln

Die Langerhans'schen Inseln wurden in ein steriles Reaktionsgefäß (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) überführt und für fünf Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 350 µl RLT Puffer (Qiagen GmbH, Hilden) resuspendiert, welcher beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:100 beinhaltete. Die Homogenisierung des

Lysates durch ein QIAshredder-Röhrchen und die Elimination der genomischen DNA mit Hilfe der gDNA-Eliminatorsäule entspricht den gleichen Schritten der RNA-Isolierung der INS-1 beta-Zellen mit dem RNeasy® Plus Mini Kit (vgl. Kap. 2.2.5.1). Nach Gabe des mit 70 %-igem Ethanol angereichertem Lysates auf eine RNeasy®-MinElute spin column (Qiagen GmbH, Hilden) und Waschen der darin gebundenen RNA mit RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer folgte ein weiterer Waschschritt der RNA mit 500 µl 80 %-igem Ethanol durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen pro Minute. Die Säulen wurden danach in ein neues Sammelröhrchen gesteckt und bei geöffnetem Deckel für fünf Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei das Ethanol vollständig verdunstete. Anschließend wurde die RNA-Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt. 14 µl RNase-freies Wasser wurden direkt in der Mitte der Säule mit sterilen Pipettenspitzen aufgetragen. Bei der nachfolgenden Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen für eine Minute wurde die RNA aus der Säule herausgewaschen und in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

#### 2.2.6 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Jeweils 5 µl der Proben wurden mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt. Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) in UVetten® (Eppendorf, Hamburg) mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg). Es wurde die optische Dichte (OD) der RNA bei 260 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz (OD = Konzentration x Schichtdicke der Küvette x Extinktionskoeffizient) berechnet. Da eine OD 260 von 1 einer Ribonukleinsäurekonzentration von 40 ng/µl entspricht, ließ sich die Konzentration nach der Formel RNA-Konzentration [ng/µl] = OD 260 x 40 x Verdünnung berechnen. Es wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von OD 260 zu OD 280 zwischen 1,8 und 2 lag, sodass man davon ausgehen konnte, dass die Proben keine Verunreinigungen durch Proteine aufwiesen.

#### 2.2.7 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die isolierte RNA in DNA überführt. Dies geschieht durch die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die reverse Transkription erfolgte gemäß der Anleitung des High Capacity Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Bei der darin verwendeten MultiScribe™ reversen Transkriptase handelt es sich um eine rekombinante Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (rMoMuLV). Diese benutzt die einzelsträngige RNA als Ma-

trize, um in Anwesenheit von Primern einen komplementären DNA-Strang herzustellen. Zunächst wurde ein Reaktionsgemisch nach folgendem Schema hergestellt (vgl. Tab. 2.2.2):

Reagenz	Volumen pro Probe [µl]
10 x RT-Buffer	2
10 x Random Primers	2
25 x dNTP-Mix	0,8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µI	1
Nuclease-free Water	4,2
Gesamt	10

Tab. 2.2.2 Reaktionsgemisch für die reverse Transkription

Von jeder Probe der INS-1 beta-Zellen wurde 1 µg RNA umgeschrieben. Das dafür benötigte Volumen wurde über die zuvor gemessene RNA-Konzentration der Probe berechnet und mit sterilen Pipetten in ein steriles Nuklease-freies Reaktionsgefäß (PCR-Tubes, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) überführt. Das Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Schließlich wurden zu jeder Probe weitere 10 µl des zuvor hergestellten Reaktionsgemisches gegeben, sodass ein Endvolumen von insgesamt 20 µl bestand. Dieses Gemisch wurde dann durch Schütteln auf einem Vortexer homogenisiert und kurz abzentrifugiert. Die Reaktionsgefäße wurden in einen Thermocycler (Biometra - Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) überführt und das Programm zur reversen Transkription gemäß der Anleitung des High Capacity Reverse Transcription Kits gestartet. Die einzelnen Schritte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet (vgl. Tab. 2.2.3):

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	10	25
2	120	37
3	5	85
4	×	4

Tab. 2.2.3 Schritte der reversen Transkription im Thermocycler

#### 2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion) ist eine *in vitro* Methode, um selektiv bestimmte Desoxyribonukleinsäuresequenzen enzymkatalysiert zu amplifizieren. Das Prinzip beruht auf dem Durchlaufen von sich wiederholenden Zyklen bestehend aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der spezifischen Primer (Primer-Annealing) und der sich anschließenden Verlängerung der Primer entlang der Matrizen-DNA durch eine DNA-Polymerase (Elongation). Hierdurch kommt es zur Anreicherung definierter DNA-Fragmente (Mullis et al., 1987). Im Gegensatz zur konventionellen PCR, in der die PCR-Produkte nach der Amplifikation in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, ermöglicht die real-time PCR die Amplifikation und die Detektion der Amplifikate in einem Ansatz (Bustin et al., 2005).

Für die Messung der Genexpression wurde in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Sybr Green I ist ein Farbstoff, der in Lösung nur eine geringe Fluoreszenz aufweist. Gebunden an doppelsträngige DNA fluoresziert er stark. Während der Elongationsphase wird Sybr Green I in die entstehenden DNA-Doppelstränge der Amplifikate eingebaut. Das optische System des verwendeten PCR-Gerätes (Step One Plus Systems, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) führt über eine Licht emittierende Diode zur Exzitation des Fluorophors bei 494 nm Wellenlänge. Wenn Sybr Green I an doppelsträngigen Nukleinsäuren gebunden hat, emittiert es daraufhin Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm, die von einer Photodiode detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende einer jeden Elongationsphase statt. Da bei jedem PCR-Zyklus die Menge der DNA vervielfältigt wird, nimmt die Fluoreszenz mit jedem Zyklus zu. Dies macht man sich bei der Messung der Menge der Amplifikate zu Nutze. Durch die anschließende Denaturierung zum Beginn des nächsten Zyklus, wird Sybr Green I nicht länger an der DNA gebunden und befindet sich wieder frei in Lösung, sodass die Fluoreszenz stark abnimmt (Bustin, 2000).

Zur Ermittlung der Genexpression wurde die Delta-Delta-Ct-Methode herangezogen. Diese Methode erlaubt über Gebrauch einer arithmetischen Formel eine relative Quantifizierung der Expression von Genen. Hierzu werden zunächst die Ct-Werte (Threshold Cycle) der zu untersuchenden Gene in den einzelnen Proben ermittelt. Die Ct-Werte entsprechen dabei der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau, also einen Schwellenwert (Threshold) zu erreichen. Bei Erreichen des Fluoreszenzniveaus befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Ct-Werte dienen zur Quantifizierung der Startmenge eines zu untersuchenden DNA-Abschnitts. Denn je weniger PCR-Zyklen durchlaufen werden müssen, um das Fluoreszenzniveau zu erreichen, umso mehr Startkopien eines DNA-Abschnitts haben in der Probe vorgelegen. Bei der Delta-Delta-Ct-Methode wird die Expression eines Zielgens der zu untersuchenden Probe auf dessen Expression in der Kontrollprobe bezogen (Pfaffl, 2001). Hierzu wird zunächst in jeder Probe die Expression des Zielgens auf die Expression eines sogenannten Housekeeping-Gens normiert, indem der Ct-Wert des Housekeeping-Gens vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert wird. Hierdurch erhält man den Delta-Ct-Wert der Probe. Housekeeping-Gene bzw. Referenzgene sind Gene, die in ihrer Expression nicht durch die Versuchsbedingungen reguliert und ubiguitär und homogen exprimiert werden (Gilsbach et al., 2006). Durch Subtraktion des Delta-Ct-Werts der Kontrollprobe von dem Delta-Ct-Wert der behandelten Proben erhält man den Delta-Delta-Ct-Wert. Der relative Unterschied der Expression eines Gens zwischen experimentell behandelter Probe und der Kontrolle ergibt sich aus der Formel 2 - Delta-Delta-Ct-Wert. Bei Verwendung dieser arithmetischen Formel wird davon ausgegangen, dass die DNA-Menge bei jedem Zyklus der PCR verdoppelt wird. Dies wird dadurch gewährleistet, dass der Schwellenwert für die Fluoreszenz so gewählt wird, dass er im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve einer PCR liegt (Pfaffl, 2001). Zur Veranschaulichung sind in Abb. 2.2.1 beispielhaft die Amplifikationskurven von TBP (rot) und Wnt4 (grün) zweier verschiedener Proben sowohl in linearer (vgl. Abb. 2.2.1 a) als auch in halblogarithmischer (vgl. Abb. 2.2.1 b) Form dargestellt. Die normierte Fluoreszenz ( $\Delta$  Rn) wird gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Der Schwellenwert (grüne horizontale Linie bei  $\Delta$  Rn = 1) liegt in der halblogarithmischen Darstellung im linearen Abschnitt der Kurvenverläufe. Dieser entspricht in der linearen Kurvendarstellung dem exponentiellen Abschnitt der Amplifikationskurven. Da der Schwellenwert von Wnt4 in Probe 1 ( $C_t = 19,96$ ) früher überschritten wird als in Probe 2 (Ct = 21,82) bei vergleichbaren Ct -Werten für TBP (Ct (Probe 1) = 28,63, Ct (Probe 2) = 28,41), haben in Probe 1 mehr Startkopien zu Beginn der PCR vorgelegen. Einsetzen der Ct-Werte in die Delta-Delta-Ct -Formel ergibt eine 4,36-fach stärkere Expression von Wnt4 in Probe 1 im Vergleich zu Probe 2.



Abb. 2.2.1 Darstellung der Amplifikationskurven einer real-time PCR a) lineare Darstellung

b) halblogarithmische Darstellung

Die relative Expression eines Zielgens ergibt sich durch Einsetzen der Ct-Werte in die Delta-Delta-Ct-Formel.

Die real-time PCR wurde gemäß der Anleitung des QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Handbuchs (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Dabei wurde der QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix verwendet. Dieser ist aus folgenden Komponenten zusammengesetzt (vgl. Tab. 2.2.4):

Komponent	Einzelbestandteile
HotStarTaq-DNA-Polymerase	
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR Green PCR Puffer:	Tris <sup>.</sup> Cl
	KCI
	(NH4)2SO4
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	pH 8,7 (20 °C)
dNTP Mix:	dATP
	dGTP
	dCTP
	dTTP
	dUTP
Fluoreszenzfarbstoffe:	SYBR Green I
	ROX
RNase-freies Wasser	

Tab. 2.2.4 Komponenten des QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mixes

Die HotStarTaq DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form der Taq-DNA-Polymerase. Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus dem Bakterium Thermus aquaticus (Taq) und ist außerordentlich hitzestabil. Die HotStarTaq-DNA-Polymerase hat keine enzymatische Aktivität bei Raumtemperatur. Dadurch wird die Bildung von Primerdimeren und unspezifischen PCR-Produkten vor Beginn der PCR verhindert. Das Enzym wird erst durch einen sogenannten Hotstart aktiviert. Dabei wird das gesamte Reaktionsgemisch am Beginn der PCR für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Der Fluoreszenzfarbstoff ROX ist ein passiver Referenzfarbstoff. Dieser wird als interne Referenz zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals benutzt. Die Fluoreszenz von ROX ist während der PCR konstant und ist nicht an der eigentlichen PCR-Reaktion beteiligt. Sein Emissionsspektrum unterscheidet sich stark von dem des Fluoreszenzfarbstoffs Sybr Green I. Dadurch ist es möglich, Fluoreszenzvariationen zwischen den einzelnen Wells auszugleichen, die durch geringe Pipettierunterschiede und Fluoreszenzfluktuationen zustande kommen können.

Für die PCR wurden QuantiTect Primer Assays (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Jeder Assay enthält spezifische forward- und reverse-Primer, die passend zur Gensequenz hergestellt wurden. Die Gensequenz ist in der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Reference Sequence Database unter Eingabe der spezifischen Identifikationsnummer des detektierten Transkripts (vgl. Tab. 2.2.5) einzusehen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore). Die Sequenzen der Primer sind ausschließlich komplementär zu Sequenzen in den Exonregionen der Gene. So binden die Primer nicht an Intronregionen, wodurch eine Koamplifikation von genomischer DNA verhindert wird. Es wurde darauf geachtet, dass die Längen der entstehenden Amplikons aller Zielgene mit denen der verwendeten Referenzgene vergleichbar waren. Dies ist wichtig, da an ein längeres PCR-Produkt während der Elongationsphase mehr Sybr Green I binden kann als an ein kürzeres doppelsträngiges DNA-Stück. So würde die stärkere Fluoreszenz des längeren Amplifikationsproduktes irrtümlich den Eindruck einer größeren Menge an Amplifikationsprodukt erwecken. Im Folgenden sind die verwendeten Primer im Detail tabellarisch aufgelistet (vgl. Tab. 2.2.5):

Offizieller Name	Offizielles Symbol	Spezies	Detektiertes Transkript	Länge des detektierten Transkripts	Amplikon- länge
TATA box bin- ding protein	ТВР	Rattus norvegicus	NM_001004198	1923 bp	90 bp
Wingless-type MMTV integra- tion site family, member 4	Wnt4	Rattus norvegicus	NM_053402	1213 bp	93 bp
Wingless-type MMTV integra- tion site family, member 10B	Wnt10b	Rattus norvegicus	XM_235636	2217 bp	132 bp
Frizzled homo- log 4 (Drosophi- la)	Fzd4	Rattus norvegicus	NM_022623	1898 bp	109 bp
Low density lipoprotein re- ceptor-related protein 5	Lrp5	Rattus norvegicus	XM_215187	5126 bp	108 bp
Transcription factor 7-like 2, T-cell specific	Tcf7l2	Rattus norvegicus	XM_342066	793 bp	144 bp

Cyclin D1	Ccnd1	Rattus norvegicus	NM_171992	3809 bp	150 bp
Actin, beta	Actb	Mus musculus	NM_007393	1889 bp	149 bp
Wingless- related MMTV integration site 4	Wnt4	Mus musculus	NM_009523	3823 bp	134 bp
Ins2	Insulin II	Mus musculus	NM_008387	467 bp	130 bp

Tab. 2.2.5 Verwendete Primer für die real-time PCR

Für die Berechnung der relativen Expressionen der Zielgene nach der Delta-Delta-Ct-Methode wurde zunächst sichergestellt, dass die jeweiligen Effizienzen von der Zielgenamplifikation und der Referenzgenamplifikation annähernd gleich waren. Dazu wurden die Delta-Ct-Werte in Abhängigkeit von logarithmisch dargestellten Probenkonzentrationen aufgetragen und eine Regressionsgerade berechnet. Verwendet wurden hierbei die cDNA von INS-1 beta-Zellen für die Ratten-Primer und cDNA von primären murinen Inseln für die Maus-Primer. Für alle angegebenen Primer wurde sichergestellt, dass der Betrag der Steigung der jeweiligen Regressionsgeraden wie für die Verwendung der Delta-Delta-Ct-Methode erforderlich weniger als 0,1 betrug. Sämtliche Regressionsgeraden sind im Folgenden grafisch dargestellt (vgl. Abb. 2.2.2 und Abb. 2.2.3).



**Abb. 2.2.2** Regressionsgeraden zum Effizienzvergleich der Amplifikationen von Zielgenen und dem verwendeten Referenzgen beta-Aktin der **Maus** 



**Abb. 2.2.3** Regressionsgeraden zum Effizienzvergleich der Amplifikationen von Zielgenen und dem verwendeten Referenzgen TBP der **Ratte** 

Zunächst wurde für jeden Primer Assay ein eigenes Reaktionsgemisch vorbereitet. Dies beinhaltete für jedes Well einer 96-Well-Platte (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) folgende Reagenzien (vgl. Tab. 2.2.6):

Bestandteil	Volumen [µl]	
2 x QuantiTect <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix	12,5	
10 x QuantiTect <sup>®</sup> Primer Assay	2,5	
RNase-freies Wasser	7,5	
cDNA	2,5	
Gesamt	25,0	

Tab. 2.2.6 Reaktionsgemisch der real-time PCR

In jedes Well wurden 22,5 µl des Reaktionsgemisches pipettiert und anschließend je 2,5 µl der cDNA-Proben in die entsprechenden Wells hinzugegeben. Dies entsprach bei den Proben der INS-1 beta-Zellen einer cDNA-Menge von 125 ng pro Well. Die cDNA-Menge der Primärzellen variierte, das Volumen betrug jedoch ebenfalls stets 2,5 µl. Das Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß betrug somit jeweils 25 µl. Es wurde darauf geachtet, dass bei jeder PCR die Bestimmung des Ct-Wertes jeder Probe mit jedem Primerpaar in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die 96-Well-PCR-Platte wurde mit einer Folie (MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) bedeckt und eine kurze Zentrifugation bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) angeschlossen. Danach wurde die PCR in dem real-time Cycler (Step One Puls Systems, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) gestartet. Dieser wurde gemäß den Angaben im QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbuch programmiert. Am Ende jeder Elongationsphase wurde die Fluoreszenz des an die DNA gebundenen Sybr Greens I gemessen. Es wurden folgende Schritte bei jeder PCR durchlaufen (vgl. Tab. 2.2.7):

Schritt	Zeit	Temperatur	
Initialer Hotstart	15 min	95 °C	
45 PCR-Zyklen:			
Denaturierung	15 s	94 °C	
Primer-Annealing	30 s	55 °C	
Elongation	30 s	72 °C	

Tab. 2.2.7 Zyklen der real-time PCR

Nach dem Durchlaufen der 45 PCR-Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse für die PCR-Produkte jedes einzelnen Wells angeschlossen. Durch seine bestimmte Zusammensetzung von Nukleotiden hat jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur T<sub>m</sub> (Bustin, 2000). Dies macht man sich bei der Identifizierung der PCR-Produkte zu Nutze, indem man nach allen durchlaufenen PCR-Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchführt. Dabei wird die Temperatur langsam von einem niedrigeren Wert (z. B. 60 °C) auf einen höheren gebracht (z. B. 95 °C) und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Bei niedrigen Temperaturen liegen alle PCR-Produkte in doppelsträngiger Form vor. Sybr Green I ist daher an der DNA gebunden und fluoresziert stark. Bei hohen Temperaturen denaturieren die PCR-Produkte und Sybr Green I geht wieder in Lösung. Daher nimmt die Fluoreszenz plötzlich stark ab. Die gemessene Fluoreszenz wird gegen die Temperatur aufgetragen. Durch das PCR-System wird die negative erste Ableitung der gemessenen Fluoreszenz berechnet (Kubista et al., 2006). In dieser Form der Darstellung entstehen Kurven mit charakteristischen Spitzen der Fluoreszenz (melting peaks) bei bestimmten Schmelztemperaturen, die für die Amplifikate spezifisch sind (vgl. Abb. 2.2.4). Unspezifische Produkte, wie z. B. Primerdimere, schmelzen bei niedrigeren Temperaturen und mit einem breiten Peak (Bustin, 2000). Die Schmelzkurvenanalyse wurde wie folgt direkt an die durchlaufenen 45 PCR-Zyklen angeschlossen (vgl. Tab. 2.2.8):

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	15 s
Renaturierung	60 °C	16 s
Erwärmen	1 °C/min bis 95 °C	35 min

Tab. 2.2.8 Schmelzkurvenanalyse der real-time PCR

Die Schmelztemperatur jedes Amplifikationsproduktes wurde vorab in jeweils zehn verschiedenen PCR-Durchläufen gemessen. Verwendet wurde hierfür die cDNA von INS-1 beta-Zellen und primären murinen Langerhans'schen Inseln. Aus den gemessenen Temperaturen wurden jeweils Mittelwert und das Zweifache der Standardabweichung (SD) berechnet. Wenn die Schmelztemperatur eines Amplikons in den folgenden Messungen weniger als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt war, wurde das Produkt als spezifisch angesehen.

Die Werte für die spezifischen PCR-Amplifikate sind in der folgenden Tabelle abgebildet (vgl. Tab. 2.2.9):

Amplifikationsprodukt	T <sub>m</sub> ± 2 x SD [°C]
<ul> <li>Rattus norvegicus:</li> </ul>	
• TBP	77,16 ± 0,50
• Wnt4	81,69 ± 1,10
Wnt10b	84,16 ± 0,52
• Fzd4	77,90 ± 1,09
LRP5	81,09 ± 0,49
• TCF7L2	84,16 ± 0,52
Zyklin D1	84,15 ± 0,52
- Mus musculus:	
beta-Aktin	86,10 ± 0,48
• Wnt4	83,30 ± 0,49
Insulin II	82,95 ± 0,67

Tab. 2.2.9 Schmelztemperaturen der Amplifikationsprodukte



**Abb. 2.2.4** Beispiel zur Schmelzkurvenanalyse der real-time PCR. Abgebildet sind die negativen ersten Ableitungen der Schmelzkurven (Melt Curve) der PCR-Amplifikate von TBP (rot) und Wnt4 (grün) mit ihren charakteristischen Fluoreszenzspitzen. Beispielhaft ist die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>: 81,96) der Wnt4-Amplifikate eingezeichnet.

Die Länge der PCR-Produkte wurde zudem durch Gelelektrophorese bestimmt. Die Überprüfung der Länge der Amplifikationsprodukte wurde stichprobenartig, jedoch regelmäßig durchgeführt. Ein 3 %-iges Agarosegel mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde mit TAE-Puffer (Serva Electrophoresis, Heidelberg) in einer Elektrophoresekammer bedeckt. Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuren (Waring, 1965) und kann im gebundenen Zustand durch UV-Licht sichtbar gemacht werden (Brunk et al., 1977). Jeweils 15 µl der PCR-Produkte wurden mit 3 µl Probenpuffer (Storage and Loading Buffer, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Referenz für die Amplifikationsgröße diente ein DNA-Längenstandard (Gene Ruler<sup>™</sup> Ultra Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 85 V für etwa 90 Minuten. Auf einem Gelscanner (GelDoc, Bio-Rad, München) konnten mit Hilfe der Software Quantity One (Bio-Rad, München) die Banden der PCR-Produkte durch UV-Licht sichtbar gemacht werden, deren Größen anhand des DNA-Längenstandards abgelesen und mit den angegebenen Größen in den Produktbeschreibungen der QuantiTect® Primer Assays verglichen wurden (vgl. Abb. 2.2.5).



Abb. 2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate:
a) Amplifikate der INS-1 beta-Zell: DNA-Längenstandard, Pufferkontrolle, TBP, Wnt4, Wnt10b, Frizzled-4, LRP5, TCF7L2 und Zyklin D1

**b)** Amplifikate der murinen Primärzellen: DNA-Längenstandard, Pufferkontrolle, beta-Aktin, Wnt4, Insulin II (jeweils von links nach rechts)

## 2.2.9 Zelllyse zur Proteinextraktion

Die INS-1 beta-Zellen wurden mit einem Zellschaber (Dispenser, TPP-Tissue Culture and Laboratory Technology, Trasadingen, Schweiz) vom Boden des Wells gelöst und mit 1 ml Medium in ein steriles Reaktionsgefäß (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) überführt. Danach wurden die Zellen bei 10.000 Umdrehungen für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl Zelllysepuffer (CelLytic<sup>™</sup> M Mammalian Cell Lysis/Extraction Reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim) mehrfach resuspendiert und auf einem Vortexer geschüttelt. Dann wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen erneut resuspendiert und geschüttelt. Eine Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für weitere fünf Minuten schloss sich an. Nachfolgend wurde der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in ein neues steriles Reaktionsgefäß pipettiert und dadurch von den am Boden des Gefäßes befindlichen Zellüberresten getrennt, welche verworfen wurden.

### 2.2.10 Proteinbestimmung

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte gemäß der Anleitung des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin diente bei der Proteinbestimmung als Standard. Je 10 µl jeder der einzelnen Verdünnungslösungen der Standardreihe wurden in entsprechende Wells einer 96-Well-Platte (flat-bottom, untreated, Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Proteinlysate der Proben wurde im Verhältnis 1:10 mit dem Zelllysepuffer verdünnt, damit die Proteinkonzentration nicht außerhalb der durch die Standardreihe messbaren Werte lag. Von diesen wurden ebenfalls je 10 µl pro Well pipettiert. Anschließend wurden in die Wells 200 µl der BCA-Reaktionslösung gegeben. Die Platte wurde mit einer Folie (Nunc, Wiesbaden) bedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proteinkonzentrationen in einem Absorptionsmessgerät (Microplate Reader Sunrise™, Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt.

#### 2.2.11 Western Blot

Zunächst wurde ein 12 %-iges Trenngel gegossen und im Anschluss an seine Härtung mit einem 5 %-igem Sammelgel bedeckt (Zusammensetzungen vgl. Kap. 2.1.4). Die Proteinlysate der Proben wurden mit Probenpuffer im Verhältnis 1:2 verdünnt. Der Probenpuffer war zuvor mit beta-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:20 verdünnt worden. Alle Proben wurden dann für vier Minuten auf 95 °C (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) erhitzt, wodurch die Proteine denaturiert und durch das SDS gleichmäßig negativ geladen wurden. Die Taschen des Sammelgels wurden mit den Proben gefüllt. Die Proteinmenge war in allen Taschen gleich und betrug bei den einzelnen Versuchen zwischen 10 und 25  $\mu$ g. 12  $\mu$ l eines Proteinstandards (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad, München), 5 ng rekombinantes Wnt4 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) als Positivkontrolle und eine Kontrolle, die lediglich Zelllysereagenz

und Probenpuffer zum Ausschluss unspezifischer Bindungen enthielt, liefen bei jeder Elektrophorese mit.

Die Elektrophorese fand in einer Elektrophoresekammer (Western Blot System, Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Cell, Bio-Rad, München), welche mit 1 %-igem SDS-Laufpuffer gefüllt war, bei einer Spannung von 96 V statt. Beim Lauf der Proteine von der Kathode in Richtung Anode wurden sie ihrer Größe nach aufgetrennt. Danach begann das Protein-Blotting in einer Transferkammer (Trans Blot® SD, Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad, München). Hierzu wurde nach der Elektrophorese das Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Dassel) gelegt und beidseits von mit Elektrodenpuffer (Zusammensetzung vgl. Kap. 2.1.3) befeuchteten Filterpapieren (Bio-Rad, München) bedeckt. Pro Quadratzentimeter der Membran wurden 0,8 mA Strom für ca. zwei Stunden angelegt. Dies entsprach bei einer Membranfläche von 7,2 x 8,3 cm<sup>2</sup> ca. 48 mA.

Dabei wurden die Proteine auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Als Blockpuffer und Antikörperverdünnungslösungen wurde eine 5 %-ige Milchpulverlösung verwendet. Milchpulver (Nonfat Dry Milk, Cell Signalling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) wurde hierfür zu einer einfachen TBST-Lösung gegeben. Nach dem Protein-Blotting wurde die Nitrozellulosemembran mit dem Blockpuffer auf einem Schüttler (Shaker AGT 50, Rettberg, Göttingen) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schloss sich über Nacht die Bindung des Primärantikörpers (Anti-Wnt-4-Antikörper, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) mit einer Verdünnung von 1:500 bei 4 °C an. Am nächsten Tag wurde im Anschluss an dreimaliges Waschen für je fünf Minuten mit einfacher TBST-Lösung die Sekundärantikörperlösung (Rabbit polyclonal to Goat IgG (HRP), Abcam, Cambridge, UK) mit einer Verdünnung von 1:10.000 auf die Membranen gegeben. Die Sekundärantikörper waren mit der Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt und konnten auf dem Schüttler für drei Stunden bei Raumtemperatur an den spezifischen Primärantikörpern binden.

Danach wurde die Membran erneut drei Mal für fünf Minuten mit TBST-Lösung gewaschen. Durch Chemilumineszenz konnten die Proteine detektiert werden, an denen die spezifischen Antikörper gebunden hatten. Die Membran wurde dafür mit einer Lösung, die sowohl Wasserstoffperoxid als auch Luminol enthielt (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), für fünf Minuten inkubiert. In einer Dunkelkammer wurde ein photografischer Film (Amersham Hyperfilm<sup>™</sup> ECL, High performance chemiluminescence film, GE-Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK) auf die Membranen gelegt. Das aufgrund der Peroxidasereaktion emittierte Licht konnte auf der Folie durch Einlegen dieser in eine Entwicklerlösung (Developer, Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien) sichtbar gemacht und anschließend fixiert (Rapid Fixer, Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien) werden. Anhand des Standards konnte man die Größe der detektierten Proteine in den nun sichtbaren Banden ablesen.

Daran schloss sich das Membran-Stripping zur Entfernung der gebundenen Antikörper an. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für zehn Minuten mit einer Strippinglösung (Restore Western blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) behandelt und im Anschluss drei Mal für fünf Minuten mit TBST-Lösung gewaschen. Nach dem erneuten Blocken der Membran erfolgte die Bindung des 1:5.000 verdünnten beta-Aktin-Primärantikörpers (Anti-beta-Aktin-Antikörper, Sigma-Aldrich, Steinheim) über Nacht. An die Bindung des geeigneten Sekundärantikörpers (Rabbit polyc-Ional to Mouse IgG (HRP), Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:10.000 schloss sich die Chemilumineszenz-vermittelte Detektion der beta-Aktin-Banden zur Quantifizierung der eingesetzten Proteinmenge pro Probe an. Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Image J 1.43u (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Das Programm berechnet für jede Western Blot-Bande einen Flächenwert, der sich aus den beiden Faktoren Bandbreite und Graustufe zusammensetzt. Für jede Probe und für die Kontrolle wurde der Flächenwert von Wnt4 auf den Flächenwert von beta-Aktin derselben Probe bzw. Kontrolle durch Bildung des Quotienten Flächenwertwnt4/Flächenwertbeta-Aktin bezogen. Für die Angabe von Relativwerten wurde jeweils der Quotient einer Probe auf den Quotienten der Kontrolle nach der folgenden Formel bezogen:

> (Flächenwertwnt4 / Flächenwertbeta-Aktin)Probe (Flächenwertwnt4 / Flächenwertbeta-Aktin)Kontrolle

#### 2.2.12 Transiente Transfektion von INS-1 beta-Zellen

Bei der transienten Transfektion von INS-1 beta-Zellen wurden das Topflash-Plasmid und das pRL-TK-Plasmid verwendet. Das Topflash-Plasmid (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, Virginia, USA) ist ein TCF-Reporter-Plasmid und stellt eine Positivkontrolle für Untersuchungen zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs dar. Das sich darauf befindliche Reportergen kodiert für die sogenannte LeuchtkäferLuciferase (Firefly Luciferase). Der vorgeschaltete Thymidinkinase-Promotor des Herpes-simplex-Virus sorgt für eine niedrige basale Expression der Luciferase. Durch drei vor den Promotor klonierte Bindungsstellen für TCF-Transkriptionsfaktoren wird die Expression der Firefly-Luciferase stark gesteigert, sobald der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert wird. Die auf dem Plasmid als Reportergen kodierte Leuchtkäfer-Luciferase ist ein monomeres Protein, welches enzymatische Aktivität ohne posttranslationale Prozessierung aufweist. Die Biolumineszenz wird durch folgende Oxidationsreaktion generiert, welche durch die Luciferase katalysiert wird:

Leuchtkäfer-Luciferin + ATP + O<sub>2</sub> → Oxyluciferin + Pyrophosphat + CO<sub>2</sub> + Licht (562nm)

Das pRL-TK-Plasmid (Promega, Mannheim) besitzt als Reportergen die Seefeder-Luciferase (Renilla Luciferase) ebenfalls mit vorgeschaltetem Thymidinkinase-Promotor. Dieser sorgt wie der Thymidinkinase-Promotor des Topflash-Plasmid für eine moderate konstitutive Expression des Reportergens. Die Seefeder-Luciferase ist ebenfalls nicht auf eine posttranslationale Prozessierung angewiesen. Durch sie wird folgende Oxidationsreaktion katalysiert:

Coelenterazin + O<sub>2</sub> → Coelenteramid + CO<sub>2</sub> + Licht (482 nm)

Das emittierte Licht der Reaktionen kann in einem Luminometer gemessen werden. Bei der vorliegenden Enzymkinetik gilt: Je mehr Licht gemessen wird, desto mehr Substrat wurde umgesetzt und desto mehr Luciferase wurde gebildet. Da die Luciferase des pRL-TK-Plasmids konstitutiv gebildet wird, ist die Menge an gebildetem Enzym ein relatives Maß für die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen und damit für die Transfektionseffizienz. Die gebildete Menge der Luciferase des Topflash-Plasmids hängt von der Aktivierung durch TCF-Transkriptionsfaktoren ab. Diese wiederum werden erst zu Transkriptionsaktivatoren unter Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. So gibt hier die Menge des exprimierten Reportergens ein relatives Maß für die Aktivierung des beta-Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs an. Das emittierte Licht der Firefly-Luciferase des Topflash-Plasmids wurde auf die gemessene Lichtmenge der Renilla-Luciferase des pRL-TK-Plasmids in jeder Probe bezogen (Mülhardt, 2009b).

In einer 24-Well Zellkulturplatte (Nunc, Wiesbaden) wurden 1×10<sup>5</sup> INS-1 beta-Zellen pro Well ausgesät und in 500 µl RPMI-Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit den oben beschriebenen Plasmiden transfiziert. Pro Well wurden 0,4 µg des Topflash-Plasmids, 0,1 µg des pRL-TK-Plasmids und 0,5 µg des Transfektionsreagenzes Nanofectamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) eingesetzt. Dieses besitzt eine polykationische Oberflächenstruktur, an welche negativ geladene DNA binden kann. Es werden stabile Transfektionskomplexe gebildet, die mit der Doppellipidschicht der Zellmembranen fusionieren und die Nukleinsäure in die Zelle entlassen. Die Plasmide wurden zunächst in serumfreiem Medium und Nanofectamin in sterilem PBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengeführt und bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die Komplexe aus Transfektionsreagenz und Plasmiden bilden konnte.

Nach 30 Minuten wurden je 100 µl der Transfektionskomplexlösung in jedes Well pipettiert. Die Transfektion erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen stimuliert. Dazu wurde das Medium abgenommen und mit je 250 µl der entsprechenden Stimulationslösung erneut kultiviert. Stimuliert wurden die transfizierten Zellen einerseits mit rekombinantem Wnt4 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml), rekombinantem Wnt3a (100 ng/ml) (beide R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) oder gleichzeitig mit Wnt4 und Wnt3a in den genannten Konzentrationen und andererseits mit Exendin-4 (10 nM) oder mit Exendin-4 (10 nM) und Wnt4 (10 ng/ml, 100 ng/ml). Je drei Wells wurden mit denselben Stimulanzien behandelt.

Die Auswertung der Transfektionsergebnisse erfolgte 24 Stunden später. Verwendet wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Mannheim). Die Stimulationsmedien der Zellen wurden abgenommen und die Zellen für zehn Minuten mit je 100 µl des Lysepuffers (Passive Lysis Buffer, Promega, Mannheim) behandelt. Dann wurde durch Resuspensieren das Zelllysat der einzelnen Proben homogenisiert. 5 µl jeder Probe wurden in ein Polystyrol-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und anschließend 25 µl des Substrats der Firefly-Luciferase (Luciferase Assay Reagent, Promega, Mannheim) dazu gegeben und durch Resuspensieren mit der Probe vermengt.

Die Messung der nun entstandenen Biolumineszenz erfolgte im Luminometer (Lumat LB9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad). Im Anschluss wurden in dasselbe Röhrchen 25 µl der Stop & Glow-Reagenzlösung (Promega, Mannheim) pipettiert. Diese Lösung führt zu einer starken Abnahme der Firefly-Luciferaseaktivität um mindestens den Faktor 10<sup>4</sup>. Gleichzeitig enthält sie das Substrat der Renilla-Luciferase, deren Aktivität unmittelbar darauf im Luminometer gemessen wurde. Zur Berechnung der relativen Topflash-Aktivität wurde zunächst für jede Probe der Quotient der Lumineszenz-
Messwerte von Firefly- und Renilla-Luciferase gebildet. Die drei Quotienten der jeweils gleich behandelten Proben wurden gemittelt. Diese Mittelwerte wurden relativ zu den Mittelwerten der Kontrollen in Prozent angegeben.

#### 2.2.13 Reverse Transfektion von INS-1 beta-Zellen mit Wnt4-spezifischer siRNA

Der Knockdown von endogenem Wnt4 in INS-1 beta-Zellen erfolgte im Rahmen von RNA-Interferenz mittels sequenzspezifischer siRNA. Die RNA-Interferenz bezeichnet einen Prozess, bei dem es induziert durch doppelsträngige intrazytoplasmatische RNA zum sequenzspezifischen Abbau von mRNA kommt. In der Zellkultur werden synthetisch hergestellte, als small interfering RNA (siRNA) bezeichnete, zielgenspezifische Fragmente verwendet, die meist durch Transfektionsreagenzien in die Zellen eingebracht werden. Es folgt die Direktion der RNA an den sogenannten RNA Induced Silencing Complex (RISC) mit anschließender Bindung des als Antisense-bzw. Führungsstrang bezeichneten Teils der RNA. Der komplementäre Sense-Strang wird abgespalten. An die nun einzelsträngige RNA, welche im RISC gebunden ist, kann sich endogene komplementäre RNA anlagern. Diese wird dann wiederum gespalten, die Bindung zum Antisense-Strang aufgelöst und im Zytoplasma durch Exonukleasen abgebaut. Der Prozess der sequenzspezifischen RNA-Degradation kann so in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt werden (Mülhardt, 2009a).

Für den Knockdown von endogenem Wnt4 in INS-1 beta-Zellen wurden drei verschiedene siRNA-Moleküle verwendet, die jeweils Komplementarität zu unterschiedlichen Sequenzabschnitten der Wnt4-mRNA aufwiesen (Rn\_Wnt4\_4 FlexiTube siRNA, Rn\_Wnt4\_5 FlexiTube siRNA, Rn\_Wnt4\_6 FlexiTube siRNA, Qiagen GmbH, Hilden). Eine unspezifische siRNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen GmbH, Hilden) ohne Homologie zu jedwedem bekannten Gen in Säugetierzellen wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die reverse Transfektion erfolgte in 96-Well-Zellkulturplatten (Fbottom, Greiner Bio-One, Frickenhausen) gemäß der Anleitung des Handbuches des HiPerFect-Transfektionsreagenzes (Qiagen GmbH, Hilden). Reverse Transfektion bedeutet, dass zuerst die Komplexbildung zwischen siRNA und Transfektionsreagenz stattfindet und anschließend die zu transfizierenden Zellen zugeführt werden. Zur Bildung des siRNA/Transfektionsreagenz-Komplexes wurden zunächst die in 25 µl RNase-freiem Wasser verdünnte siRNA und das in 25 µl serumfreiem RPMI-Medium verdünnte Transfektionsreagenz (HiPerFect-Transfektionsreagenz, Qiagen GmbH, Hilden) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden pro Well  $1 \times 10^4$  INS-1 beta-Zellen in 150 µl RPMI-Medium ausgesät und über 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Jeweils 8 Wells wurden mit den gleichen Reagenzien behandelt. Die Referenzkontrolle enthielt weder Transfektionsreagenz noch siRNA. Zusätzlich gab es eine Kontrolle, die zwar Transfektionsreagenz aber keine siRNA beinhaltete. Die Endkonzentrationen der verschiedenen siRNAs betrug 10 nM pro Well. Bei dieser Konzentration wurde zuvor mittels Transfektion mit Fluoreszenz-gekoppelter unspezifischer siRNA (Allstars Neg. siRNA AF 488, Qiagen GmbH, Hilden) eine Transfektionseffizienz von 55 ± 18 % nach 24 Stunden, 82 ± 12 % nach 48 Stunden und 78 ± 12 % nach 72 Stunden ermittelt (vgl. Abb. 2.2.6).



Abb. 2.2.6 Transfektion mit Fluoreszenz-gekoppelter siRNA:

**a)** Aufnahme der mit Alexa-Fluor 488 gekoppelten siRNA in die INS-1 beta-Zellen nach einer Transfektionszeit von 48 Stunden

**b)** Im Vergleich dazu sind die untransfizierten INS-1 beta-Zellen bei gleicher Belichtungszeit unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Einen Überblick der einzelnen Probenzusammensetzungen pro Well gibt die folgende Tabelle (vgl. Tab. 2.2.10):

Bestand- teil Proben- bezeich- nung	RNase- freies Wasser [µl]	Nega- tive Control siRNA [µl]	Wnt4_4 Flexi- Tube siRNA [µl]	Wnt4_5 Flexi- Tube siRNA [µl]	Wnt4_6 Flexi- Tube siRNA [µl]	Serum- freies Medium [µl]	HiPer- Fect [µl]	RPMI mit 1×10⁴ INS-1 beta- Zellen [μl]
Referenz- kontrolle	25	-	-	-	-	25	-	150
Transfek- tionsre- agenz	25	-	-	-	-	24,25	0,75	150
unspezifi- sche siRNA	24,9	0,1	-	-	-	24,25	0,75	150
spezifische Wnt4-siRNA Nr. 1	24,9	-	0,1	-	-	24,25	0,75	150
spezifische Wnt4-siRNA Nr. 2	24,9	-	-	0,1	-	24,25	0,75	150
spezifische Wnt4-siRNA Nr. 3	24,9	-	-	-	0,1	24,25	0,75	150

Tab. 2.2.10 Probenzusammensetzung der Wnt4-spezifischen RNA-Interferenz

Zur Überprüfung der Effektivität des Wnt4-Knockdowns in INS-1 beta-Zellen wurde mehrmalig nach 48 Stunden Transfektion die Expression von Wnt4 durch real-time PCR und Western Blot ermittelt. Bezogen auf die Referenzkontrollen wurde die Expression von Wnt4 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene um etwa 71 % vermindert. Die genauen Werte der relativen Wnt4-Expressionen betrugen für die Wnt4-siRNAs Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3 in entsprechender Reihenfolge  $0,22 \pm 0,01, 0,43 \pm 0,05$  und  $0,21 \pm 0,08$  auf RNA-Ebene und  $0,22 \pm 0,09, 0,38 \pm 0,19$  und  $0,29 \pm 0,21$  auf Proteinebene (vgl. Abb. 2.2.7). Weder die Behandlung der Zellen mit dem Transfektionsreagenz alleine noch mit der unspezifischen siRNA hatte einen signifikanten Effekt auf die Expression von Wnt4. Die Bestimmung der Expression von Zyklin D1 unter Wnt4-Knockdown erfolgte durch die real-time PCR.



**Abb. 2.2.7** Bestimmung der Expression von Wnt4 unter Wnt4-spezifischem Knockdown: Im Bezug auf die Referenzkontrolle wurde die Expression von Wnt4 durch Transfektion mit den drei verschiedenen siRNA-Sequenzen im Durchschnitt auf **a**) 29 ± 12% auf mRNA-Ebene und auf **b**) 29 ± 10 % auf Proteinebene vermindert. Weder die Behandlung der Zellen mit Transfektionsreagenz allein noch mit der unspezifischen siRNA zeigte einen signifikanten Effekt auf die Wnt4-Expression.

**c)** (modifiziert nach Abb. 4 A in Heller et al., 2011) Repräsentativer Western Blot: Als Positivkontrolle wurde rekombinantes Wnt4 verwendet. Beta-Aktin diente als Ladungskontrolle. Durch das Mitlaufen von Zelllysereagenz und Probenpuffer wurden unspezifische Bindungen ausgeschlossen.

Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von drei voneinander unabhängigen Versuchen. n.s. = nicht signifikant, \* p < 0.05.

#### 2.2.14 Bestimmung der Proliferation von INS-1 beta-Zellen unter Wnt4spezifischem Knockdown

Anhand des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA kann eine Aussage über die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Proliferation der zu untersuchenden Zellen gemacht werden. Voraussetzung dafür ist, dass zu Beginn alle Proben die gleiche Anzahl von Zellen enthalten. Nach einer bestimmten Kultivierungszeit wird dem Nährmedium radioaktives [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugefügt. Dieses wird bei jeder Zellteilung während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut. Je mehr Radioaktivität gemessen werden kann, desto mehr [<sup>3</sup>H]-Thymidin ist in die DNA der Zellen eingebaut worden und desto mehr Zellteilungen haben stattgefunden. Vergleicht man die gemessenen Radioaktivitäten verschiedener Proben, so kann man eine Aussage über die proliferationsmodulierende Wirkung der Proben auf die verwendeten Zellen im Vergleich zu Kontrollen machen (Luttman W. et al., 2009a; Naito et al., 1987).

Zur Bestimmung der Proliferation der INS-1 beta-Zellen unter Wnt4-spezifischem Knockdown wurde nach 48 Stunden Inkubation in jedes Well [<sup>3</sup>H]-Thymidin (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) mit einer Radioaktivität von 37 kBg (= 1 µCi) pipettiert. Die Zellen wurden weitere 18 Stunden inkubiert. Danach wurde die Zellkulturplatte in den FilterMate Harvester (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt und das Medium entfernt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Wasser für zehn Minuten durch den osmotischen Druck lysiert. Das Wasser mit den darin enthaltenen Zell- und DNA-Fragmenten wurde dann durch die Glasfaserfilter einer speziellen 96-Well-Platte (UniFilter<sup>®</sup>-96, GF/C<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) gesogen. Das freie nicht-inkorporierte Thymidin konnte im Medium gelöst die Filter passieren. Die DNA mit dem eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidin blieb dagegen im Filter hängen. Die Filterplatte wurde dann bei 50 °C für eine Stunde getrocknet. Im Anschluss wurden auf jeden Glasfaserfilter der Platte 25 µl eines beta-Szintillationscocktails (Betaplate Scint, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) gegeben. Die Radioaktivität des in die DNA eingebauten [<sup>3</sup>H]-Thymidin wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (1450 MicroBeta Trilux, Liquid scintillation and luminescence counter, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) gemessen. Über die Mittelwerte der jeweils acht mit den gleichen Reagenzien behandelten Wells wurde die Proliferation der Proben relativ zu den Referenzkontrollen berechnet.

#### 2.2.15 Messung der Insulinsekretion

Die Messung der Insulinkonzentration der abgenommenen Überstände der primären Langerhans'schen Inseln der Maus erfolgte durch einen Insulin-Radioimmunoassay. Der Radioimmunoassay ist ein kompetitiver Assay. Grundvoraussetzung sind die konstanten Mengen an radioaktiv markiertem Antigen, dem sogenannten Tracer, und an antigenspezifischem Antikörper. Dabei muss die Anzahl der Antigenbindungsstellen begrenzt sein, sodass nur ein Teil der Tracermoleküle von den Antikörpern gebunden werden kann. Das radioaktiv markierte Antigen und das nicht radioaktive Antigen aus der zu messenden Probe konkurrieren um die Bindungsstellen an den spezifischen Antikörpern. Je mehr Antigen in der Probe enthalten ist, desto weniger Tracermoleküle werden von den Antikörpern gebunden. Werden nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes die Antigen-Antikörper-Komplexe von den übrigen freien ungebundenen Antigenen getrennt, so kann durch Messung der Radioaktivität in der gebundenen Fraktion auf die Menge des in der Probe enthaltenen Antigens zurückgeschlossen werden. Je niedriger die gemessene Radioaktivität ist, umso mehr Antigen muss in der Probe vorhanden gewesen sein (Luttman W. et al., 2009b).

Die Durchführung der Insulinmessung erfolgte gemäß der Anleitung aus dem Handbuch des Radioimmunoassays (Insulin-RIA Kit, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). Als Tracer wurde hierbei Insulin verwendet, welches mit dem Gammastrahler <sup>125</sup>lod markiert war. Als Reaktionsgefäße wurden Polystyrol-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) eingesetzt. Jede Messung fand als Doppelbestimmung statt. Das Pipettierschema ist in der nachfolgenden Tabelle abgebildet (vgl. Tab. 2.2.11).

	Tag 2				
Probennummer Assay- Puffer [µ		Standard/ Quali- tätskontrolle/ Proben [µl]	<sup>125</sup> I-Insulin Tracer [µl]	Insulin- Antikörper- Serum [µl]	Präzipitations- Reagenz [ml]
1, 2 (total count tubes)	-	-	100	-	-
3, 4 (Leerwertpro- ben)	200	-	100	-	1,0
5, 6 (Nullstandard)	100	-	100	100	1,0
7, 8 (0,1 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
9, 10 (0,2 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
11, 12 (0,5 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
13, 14 (1,0 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
15, 16 (2,0 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
17, 18 (5,0 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0
19, 20 (10 ng/ml Insulin)	-	100	100	100	1,0

21, 22 (Qualitätskontrolle)	-	100	100	100	1,0
23, 24 (Probe 1)	-	100	100	100	1,0
25, ,n mit n= 2 x (Anzahl der Proben) + 22	-	100	100	100	1,0

Tab. 2.2.11 Probenzusammensetzung Insulin-RIA

Die "total count tubes" enthielten ausschließlich <sup>125</sup>I-Insulin Tracer. Die Röhrchen für die Leerwerte wurden mit dem Assay-Puffer und dem <sup>125</sup>I-Insulin Tracer behandelt. Die Röhrchen des Nullstandards wurden mit Assay-Puffer, <sup>125</sup>I-Insulin Tracer und Insulin-Antiserum befüllt. Zur Erstellung der Standardreihe wurden je 100 µl der mitgelieferten Insulinstandards in aufsteigender Konzentration pipettiert. Als Qualitätskontrolle dienten je 100 µl des ebenfalls mitgelieferten gereinigten Ratteninsulins bekannter Konzentration gelöst in Assay-Puffer. Passende Verdünnungen der Überstände der murinen Langerhans'schen Inseln mit Assay-Puffer wurden in Vorversuchen ermittelt. Je 100 µl der verdünnten Proben wurden pro Röhrchen eingesetzt. Dann wurden 100 µl des <sup>125</sup>I-Insulin Tracers hinzupipettiert und anschließend 100 µl des Insulin-Antiserums zugefügt. Die Reaktionsröhrchen wurden geschüttelt und mit Folie abgedeckt. Die Einstellung des Präzipitationsreagenzes den Proben beigefügt. Das Präzipitationsreagenzes den Proben beigefügt. Das Präzipitationsreagenzes den Proben beigefügt. Das Präzipitationsreagenzes den Proben beigefügt.

Die Trennung beruht auf der Bindung der Insulin-Antikörper an Sekundärantikörper, die im Präzipitationsreagenz enthalten sind und spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers binden. Es kommt zur Vernetzung der Primärantikörper mit der Folge, dass die Antigen-Antikörper-Komplexe ausgefällt werden. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Röhrchen bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die ausgefällten Komplexe wurden so an den Böden der Röhrchen konzentriert und der Überstand mit den darin frei gelösten Antigenen abgesaugt, die nicht von Antikörpern gebunden worden waren. Die Überstände der "total count tubes" wurden nicht abgenommen. Direkt im Anschluss fand die Messung der Radioaktivität in einem Gammazähler (LB2111, Berthold, Bad Wildbad) statt.

Sein Detektionssystem besteht aus einem mit 1% Thalliumoxid aktivierten Natrium-Jodid-Kristall. Dieser ist mit einem Photomultiplier verbunden. Der Szintillationskristall absorbiert die vom <sup>125</sup>I-Insulin Tracer ausgehenden Gammastrahlen und sendet ein Bündel Photonen aus. Die Photonen bewirken an der Kathode des Photomultipliers die Emission von Photoelektronen. Durch die Dynodenkette des Photomultipliers kommt es zu einer Verstärkung des Elektronenflusses. Dieser führt an der Anode zur Abgabe eines Stromimpulses. Über einen Verstärker gelangt der Impuls zu einem Zähldiskriminator, durch welchen die Zählraten (counts per minute, cpm) bestimmt werden.

Zur Ermittlung der Insulinkonzentrationen wurde zunächst die gemittelte Zählrate der beiden Leerwertproben angegeben in "counts per minute" von den gemittelten Zählraten der anderen Proben abgezogen, um so die durch unspezifische Bindungen entstandenen Zählraten zu eliminieren. Die daraus resultierende Zählrate der Proben (B) wurde auf die des Nullstandards (B<sub>0</sub>) bezogen. Das Verhältnis von B zu B<sub>0</sub> (B/B<sub>0</sub>) ist ein Maß für die relativen Bindungen der Antikörper an die Insulinantigene in den einzelnen Proben. Als nächster Schritt erfolgte eine Kurvenanpassung, um die Beziehung zwischen Zählrate und Insulinkonzentration des Assays durch ein mathematisches Modell beschreiben zu können. Hierfür wurde zunächst eine Umwandlung der Standardkurve, in der die relativen Bindungen (B/B<sub>0</sub>) der Standardproben gegen die Insulinkonzentrationen aufgetragen sind, in einen Logit-Log-Plot durchgeführt. In diesem Logit-Log-Plot werden die Insulinkonzentrationen in den natürlichen Logarithmus umgerechnet und auf der Abzisse eingetragen, während die gemessenen Werte für die relativen Bindungen der Standardproben auf der Ordinate als Logit-Werte dargestellt werden. Für einen Logit-Wert einer relativen Bindung Y gilt: Logit Y =  $\ln (Y/(1-Y))$ . Für die in dieser Transformation dargestellten Werte der Standardproben wurde dann eine passende Regressionskurve berechnet, nachdem die Prüfung auf Wertausreißer und eine passende Gewichtung der einzelnen Messdaten vorgenommen worden war. Anhand dieser Regressionskurve konnte nach dem Messen der Zählraten der einzelnen Proben und Berechnung ihrer relativen Bindungen auf deren Insulinkonzentrationen zurückgeschlossen werden. Dazu wurde die zunächst in logarithmisierter Form dargestellte Konzentration durch Exponenzieren entlogarithmisiert. Ein Beispiel zur Erstellung der Regressionskurve geben folgende Tabelle (vgl. Tab. 2.2.12) und folgende Abbildung (vgl. Abb. 2.2.8).

Probenbe- zeichnung	gemittelte Zählrate [cpm]	Zählrate der Proben (B) = Diffe- renz zur gemittelten Zählrate d. Leerwert- proben	relative Bindung (B/B₀)	Logit- Werte der relativen Bindungen (B/B₀)	In (Konz.)	Insulin- konzentra- tionen [ng/ml]
Leerwertpro- ben	537,2	0	-	-	-	-
Nullstandard	5100,9	4563,7 <i>(B<sub>0</sub>)</i>	1,00	-	-	0
Standard	4774,6	4237,4	0,92	2,56	-2,30	0,1
Standard	3302,6	2765,4	0,61	0,43	0	1,0
Standard	1039,7	502,5	0,11	-2,10	2,30	10,0
Probe unbe- kannter Insu- linkonzentra- tion	1370,2	833,0	0,18	-1,49	2,08	8,0

Tab. 2.2.12 Beispieltabelle zur Konzentrationsbestimmung von Insulin



Abb. 2.2.8 Logit-Log-Plot zur Konzentrationsberechnung von Insulin

Anhand der Regressionsgeraden kann von den Logit-Werten der relativen Insulin-Antikörperbindungen auf den natürlichen Logarithmus der Insulinkonzentration geschlossen werden. Entlogarithmisieren ergibt die gesuchte Insulinkonzentration einer Probe.

#### 2.2.16 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte durch Anwendung des ANOVA-Tests (One-Way Analysis of Variance Test) mit anschließender Bonferroni-Korrektur als Posttest. Beim Vergleich von nur zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei einem p-Wert von kleiner 0,05. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Computerprogramms Prism 4.0 (Graph Pad Software, Dan Diego, Kalifornien, USA).

#### 3 Ergebnisse

# 3.1 Regulation der mRNA-Expressionen von Wnt-Signalmolekülen durch Antidiabetika und verschiedene Glukosekonzentrationen in INS-1 beta-Zellen

INS-1 beta-Zellen wurden für 24 Stunden mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1 µM, 10 µM, 50 µM), Tolbutamid (10 µM, 100 µM, 250 µM), Metformin (10 µM, 50 μM, 500 μM), Insulin (0,1 μM, 1 μM, 10 μM) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM) stimuliert. Die Untersuchung der Expressionen der Wnt-Liganden Wnt4 und Wnt10b, des Wnt-Rezeptors Frizzled-4, des Korezeptors LRP5 und des Transkriptionsfaktors TCF7L2 erfolgte anhand der im Methodenteil beschriebenen real-time PCR. Die mRNA-Expressionen unter Antidiabetikastimulation werden relativ zu mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen angegeben. Die relativen Expressionen der Wnt-Signalmoleküle unter Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen beziehen sich auf die mit 11 mM Glukose behandelte Gruppe. Die Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit dem GLP-1-Analogon Exendin-4 führte zu einer signifikant verstärkten Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen. Die relativen Expressionen betrugen bei 1 nM, 10 nM und 100 nM Exendin-4 in entsprechender Reihenfolge 2,0  $\pm$  0,53, 2,94  $\pm$  1,51 und 2,66  $\pm$  0,99 (vgl. Abb. 3.1.1). Die anderen untersuchten Wnt-Signalmoleküle wurden nicht durch die Stimulation mit Exendin-4 in ihrer Expression verändert. Sowohl die Antidiabetika Rosiglitazon, Tolbutamid, Metformin und Insulin als auch die getesteten Glukosekonzentrationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der untersuchten Wnt-Signalmoleküle (vgl. Abb. 3.1.1- Abb. 3.1.5) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.1.1** (modifiziert nach Abb. 1 A in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von **Wnt4** in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), Metformin (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M), Tolbutamid (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M), Insulin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05



**Abb. 3.1.2** (modifiziert nach Abb. 1 B in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von **Wnt10b** in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), Metformin (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M), Tolbutamid (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M), Insulin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.



**Abb. 3.1.3** (modifiziert nach Abb. 1 C in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von **Frizzled-4** in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), Metformin (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), 500  $\mu$ M), Tolbuta-mid (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M), Insulin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.



**Abb. 3.1.4** (modifiziert nach Abb. 1 D in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von LRP5 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), Metformin (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M), Tolbutamid (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M), Insulin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.



**Abb. 3.1.5** (modifiziert nach Abb. 1 E in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von **TCF7L2** in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (1 nM, 10 nM, 100 nM), Rosiglitazon (0,1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), Metformin (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 500  $\mu$ M), Tolbutamid (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M), Insulin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Glukose (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.

# 3.2 Expression von Wnt-Signalmolekülen in INS-1 beta-Zellen unter chronischer Stimulation mit niedriger, mittlerer und hoher Glukosekonzentration

INS-1 beta-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen mit RPMI-Medium stimuliert, welches eine niedrige, mittlere oder eine hohe Glukosekonzentration (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM) enthielt. In einem Zeitabstand von sieben Tagen wurden die Expressionen der Wnt-Signalmoleküle Wnt4, Wnt10b, Frizzled-4, LRP5 und TCF7L2 mittels real-time PCR untersucht. Dabei wurden ihre Expressionen jeweils in Relation zu denen der Kontrollgruppen berechnet, welche mit einer mittleren Glukosekonzentration von 11 mM behandelt worden waren.

Weder die Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit einer niedrigen noch mit einer hohen Glukosekonzentration hatte einen signifikanten Effekt auf die Expression sämtlicher untersuchter Wnt-Signalmoleküle im Vergleich zu mit 11 mM behandelten INS-1 beta-Zellen (vgl. Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1** Relative mRNA-Expressionen der Wnt-Signalmoleküle Wnt4, Wnt10b, Frizzled-4, LRP5 und TCF7L2 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit niedriger, mittlerer und hoher Glukosekonzentration (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die mRNA-Expressionen wurden jeweils im Abstand von einer Woche über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.

# 3.3 Expression von Wnt4 unter Stimulation mit Exendin-4 in primären Langerhans'schen Inseln der Maus

Isolierte primäre murine Langerhans'sche Inseln von zwei Monate alten C57BL/6-Mäusen wurden mit 10 nM Exendin-4 in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer stimuliert. Die Analyse der mRNA-Expression des Wnt-Liganden Wnt4 erfolgte mittels real-time PCR. Die Stimulation der primären murinen pankreatischen Inseln mit dem GLP-1-Analogon über einen Zeitraum von 24 Stunden führte zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression von Wnt4. Die relative mRNA-Expression von Wnt4 betrug im Mittel 2,83 ± 0,76 im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abb. 3.3.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.3.1** (modifiziert nach Abb. 2 A in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von Wnt4 in isolierten primären Langerhans'schen Inseln von C57BL/6-Mäusen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) über 24 Stunden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0.05

# 3.4 Expression von Wnt4-Protein unter Stimulation mit Exendin-4 in INS-1 beta-Zellen

INS-1 beta-Zellen wurden über 24 Stunden mit 10 nM Exendin-4 stimuliert. Die Ermittlung der Expression von Wnt4-Protein erfolgte durch Western Blot. Die Stimulation von INS-1 beta-Zellen mit Exendin-4 führte zu einer signifikanten Expressionsverstärkung des endogenen Wnt-Liganden Wnt4 auf Proteinebene. Die Expression von Wnt4 wurde im Mittel um mehr als das Dreifache (3,63  $\pm$  1,27) im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (vgl. Abb. 3.4.1). Ein repräsentativer Western Blot ist in Abb. 3.4.2 dargestellt. Rekombinantes Wnt4 wurde als Positivkontrolle verwendet. Durch den Einsatz von Zelllysereagenz und Probenpuffer allein ließen sich unspezifische Bindungen der Antikörper an deren Bestandteile und an die Membran ausschließen. Als Referenz zur Berechnung der relativen Expression von Wnt4 dienten die mit Lösungsmittel behandelten INS-1 beta-Zellen, welche in der Abbildung (vgl. Abb. 3.4.2) als Kontrolle bezeichnet sind. Als Ladekontrolle diente beta-Aktin, auf welches jeweils die Expressionen von Wnt4 in den einzelnen Proben normiert wurden (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.4.1** (modifiziert nach Abb. 2 B in Heller et al., 2011) Grafische Darstellung der quantitativen Auswertung von fünf voneinander unabhängig durchgeführten Western Blots zur Untersuchung der Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Exendin-4-Stimulation (10 nM). Die Expression von Wnt4 in den Kontrollen und den mit Exendin-4 stimulierten Zellen wurde stets auf die Expression von beta-Aktin in den entsprechenden Proben normiert. \* p < 0,05



**Abb. 3.4.2** (modifiziert nach Abb. 2 B in Heller et al., 2011) Repräsentativer Western Blot zur Untersuchung der Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Rekombinantes Protein diente als Positivkontrolle. Durch den alleinigen Einsatz von Zelllysereagenz und Probenpuffer wurden unspezifische Bindungen ausgeschlossen. Beta-Aktin diente als Ladungskontrolle.

# 3.5 Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an Exendin-4

INS-1 beta-Zellen wurden über 24 Stunden mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exendin-4 in aufsteigenden Konzentrationen (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) stimuliert. Mittels real-time PCR wurden die Wnt4-mRNA-Expressionen gemessen. Wie in Abb. 3.5.1 dargestellt kam es zu einem Anstieg der Wnt4-Expression unter zunehmender Konzentration an Exendin-4. Bei Stimulation mit 0,01 nM Exendin-4 bestand noch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Ab einer Konzentration von 0,1 nM Exendin-4 konnte ein konzentrationsabhängiger, signifikanter Anstieg der Wnt4-Expressionen beobachtet werden. Die relative Wnt4-mRNA-Expression war bei einer Konzentration von 10 nM Exendin-4 am stärksten und betrug 2,94 ± 1,51. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 100 nM führte nicht zu einer weiteren Expressionsverstärkung (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.5.1** (modifiziert nach Abb. 2 C in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expressionen von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an Exendin-4 über einen Stimulationszeitraum von 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05

# 3.6 Expression von Wnt4 unter Stimulation mit Exendin-4 in INS-1 beta-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit

INS-1 beta-Zellen wurden mit Exendin-4 in einer Konzentration von 10 nM stimuliert. Die mRNA der Zellen wurde nach 10 und 30 Minuten und nach 1, 2, 3, 4, 8, 12 und 24 Stunden isoliert. Die Ermittlung der Expressionen erfolgte durch real-time PCR. Vereinfachend ist in der Abb. 3.6.1 nur eine Kontrolle dargestellt, da es sich bei den Expressionsangaben um relative Werte handelt, bei denen die Kontrolle stets als 1 festgelegt wird.

Nach drei Stunden zeigte sich die Expression von Wnt4 bereits erhöht ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Statistisch signifikant war der Anstieg der Wnt4-Expression nach vier Stunden Stimulation mit Exendin-4 (2,32  $\pm$  0,5). Die stärkste Expression fand sich nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden (2,83  $\pm$  0,91) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.6.1** (modifiziert nach Abb. 2 D in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) in Abhängigkeit von der Zeit. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05.

# 3.7 Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter chronischer Stimulation mit Exendin-4

INS-1 beta-Zellen wurden alle zwei Tage über einen Zeitraum von vier Wochen mit Exendin-4 in einer Konzentration von 10 nM stimuliert. In einem Abstand von jeweils einer Woche wurde die Expression von Wnt4 im Vergleich zu den über den gleichen Zeitraum mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen mittels real-time PCR gemessen. In Abb. 3.7.1 sind die Ergebnisse aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen abgebildet. Nach einer Stimulationszeit von einer Woche zeigte sich eine signifikante etwa zweifach verstärkte Expression von Wnt4 im Vergleich zur Kontrolle (2,15 ± 0,88). Dieser Effekt blieb über den gesamten Stimulationszeitraum konstant (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.7.1** (modifiziert nach Abb. 2 E in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expressionen von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) über einen Zeitraum von vier Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05

# 3.8 Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 und dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39)

Um zu überprüfen, ob die Wirkung von Exendin-4 auf die Regulation der Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen über den GLP-1-Rezeptor vermittelt wird, wurde der GLP-1-Rezeptorantagonist Exendin-(9-39) eingesetzt. Dieser bindet als spezifischer Antagonist an den GLP-1-Rezeptor, führt dort aber nicht zu einer Aktivierung. Erneut wurde mit real-time PCR die Expression von Wnt4 nach 24 Stunden unter Stimulation mit 10 nM Exendin-4 gemessen. Die so beobachtete signifikant erhöhte Wnt4-mRNA-Expression (1,75 ± 0,26) konnte durch eine gleichzeitige Kostimulation mit dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39) in einer Konzentration von 2  $\mu$ M auf das Niveau der Kontrolle zurückgeführt werden (1,21 ± 0,15). Der Effekt von Exendin-4 auf die Expression von Wnt4 war demnach durch Antagonisierung am GLP-1-Rezeptor hemmbar. Die alleinige Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit 2  $\mu$ M Exendin-(9-39) zeigte keinen

Effekt auf die Expression von endogenem Wnt4 der beta-Zellen  $(0,97 \pm 1,7)$  (vgl. Abb. 3.8.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.8.1** (modifiziert nach Abb. 2 F in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expressionen von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (Exd-4, 10 nM), dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39) (Exd-(9-39), 2  $\mu$ M) und mit Exendin-4 und Exendin-(9-39) in den genannten Konzentrationen zusammen (Exd-4 + Exd-(9-39)). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05

## 3.9 Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit L-Zell-konditioniertem Medium

GLUTag-Zellen wurden über drei Tage in dem Zellkulturmedium D-MEM kultiviert, welches folglich sämtliche in dieser Zeit von den immortalisierten L-Zellen sezernierte Stoffe enthielt. Mit diesem konditionierten Medium wurden INS-1 beta-Zellen für 24 Stunden stimuliert. Als Kontrolle dienten sowohl das für gewöhnlich verwendete Zellkulturmedium RPMI als auch D-MEM, welches nicht in Kontakt mit L-Zellen gekommen war, jedoch über den gleichen Zeitraum im Zellkulturschrank gelagert wurde. In der Abb. 3.9.1 ist zu erkennen, dass die Stimulation mit dem L-Zell-konditionierten D-MEM zu einer signifikant gesteigerten Expression von Wnt4 (2,17  $\pm$  0,32) in INS-1 beta-Zellen sowohl im Vergleich zu dem RPMI- als auch zu dem D-MEM-Kontrollmedium führte. Die verstärkte Expression von Wnt4 konnte bei gleichzeitiger Stimulation mit dem GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39) gehemmt werden und erreichte ein nur leicht erhöhtes, nicht signifikantes Expressionsniveau im Vergleich zur Wnt4-Expression in den beiden verwendeten Kontrollmedien RPMI und D-MEM. Die Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit dem D-MEM-Kontrollmedium hatte keinen Einfluss auf die Expression von Wnt4 im Vergleich zum RPMI-Kontrollmedium (1,29 ± 0,25). Die alleinige Zugabe von Exendin-(9-39) zu den beiden Kontrollmedien RPMI und D-MEM hatte ebenfalls keine signifikanten Effekte auf die Expression von Wnt4 (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.9.1** (modifiziert nach Abb. 2 G in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expressionen von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit RPMI +/- Exendin-(9-39) (Exd-(9-39), 2  $\mu$ M), D-MEM +/- Exd-(9-39) (2  $\mu$ M) und L-Zell-konditioniertem D-MEM +/- Exd-(9-39) (2  $\mu$ M). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05.

# 3.10 Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 und verschiedenen Glukosekonzentrationen

Um herauszufinden, ob die Wirkung des GLP-1-Analogons Exendin-4 auf die Expression des Wnt-Liganden Wnt4 durch verschiedene Glukosekonzentrationen moduliert werden kann, wurden INS-1 beta-Zellen erneut für 24 Stunden mit 10 nM Exendin-4 stimuliert. Das hierbei verwendete RPMI-Medium enthielt niedrige, mittlere oder hohe Glukosekonzentrationen von 5,5 mM, 11 mM und 16,7 mM Glukose.

Es zeigte sich die bereits bekannte signifikant verstärkte Expression von Wnt4 unter Stimulation mit 10 nM Exendin-4 bei einer Glukosekonzentration von 11 mM (2,83  $\pm$  0,91). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei niedriger Glukosekonzentration von 5,5 mM (2,88  $\pm$  1,00) und bei hoher Konzentration an Glukose von 16,7 mM (2,92  $\pm$  1,26) beobachtet werden. Die Glukosekonzentration des Mediums beeinflusste die Wirkung von Exendin-4 auf die Wnt4-Expression demnach nicht (vgl. Abb. 3.10.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.10.1** (modifiziert nach Abb. 2 H in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) bei niedriger, mittlerer und hoher Glukosekonzentration (5,5 mM, 11 mM, 16,7 mM). Die Mittelwerte + SD sind relativ zur Expression von Wnt4 in der mit 11 mM Glukose behandelten Kontrolle (Mitte) angegeben. Die Werte beziehen sich auf fünf voneinander unabhängige Versuche, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden. \* p < 0,05.

# 3.11 Einfluss von Wnt4 auf die Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs in INS-1 beta-Zellen

Zur Untersuchung der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in INS-1 beta-Zellen wurden diese mit dem im Methodenteil beschriebenen Topflash-Plasmid und dem pRL-TK-Plasmid transfiziert und für 24 Stunden mit den aufgeführten Substanzen stimuliert. Anschließend wurden die durch die Firefly- und die Renilla-Luciferase hervorgerufenen Biolumineszenzen gemessen, die während des Substratumbaus entstanden. Die Messwerte wurden miteinander in Beziehung gesetzt (vgl. Kap. 2.2.12), sodass sich schließlich eine Aussage zur Wirkung der untersuchten Stimuli auf die Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs machen ließ.

Es zeigte sich, dass die Stimulation der transfizierten INS-1 beta-Zellen mit dem Wnt-Liganden Wnt4 in aufsteigenden Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) nicht zu einer signifikanten Änderung der Aktivierung des Topflash-Plasmids führte (vgl. Abb. 3.11.1). Unter Stimulation der INS-1 beta-Zellen mit 100 ng/ml rekombinantem Wnt3a, zeigte sich hingegen eine verstärkte Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs auf 154,7 ± 11,5 % im Vergleich zu mit dem Lösungsmittel PBS behandelten Kontrollen. Die verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs unter Stimulation mit Wnt3a konnte durch gleichzeitige Stimulation mit rekombinantem Wnt4 signifikant gehemmt werden. Der antagonisierende Effekt von Wnt4 war in den drei getesteten Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) vergleichbar und betrug im Durchschnitt 122,7 ± 4,0 % in Relation zu den entsprechenden Kontrollen (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.11.1** (modifiziert nach Abb. 3 A in Heller et al., 2011) Relative TCF-Reportergenaktivität (Topflash) in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit den Wnt-Liganden Wnt4 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml), Wnt3a (100 ng/ml) und unter Kostimulation mit Wnt4 und Wnt3a in den genannten Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen. \* p < 0,05

Die zuvor dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Exendin-4 die Expression von Wnt4 in beta-Zellen erhöht und Wnt4 als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs agiert. Daher wurde untersucht, ob der Effekt von Exendin-4 auf die Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs in INS-1 beta-Zellen (Liu et al., 2008) durch Kostimulation mit Wnt4 gehemmt werden kann. Die Stimulation der transfizierten INS-1 beta-Zellen mit 10 nM Exendin-4 führte zu einer starken Aktivitätssteigerung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs auf  $362,3 \pm 121,5 \%$  im Vergleich zur Kontrolle. Diese verstärkte Aktivierung unter Exendin-4 konnte nicht durch Kostimulation mit rekombinantem Wnt4 in den getesteten Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml gehemmt werden (vgl. Abb. 3.11.2) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.11.2** (modifiziert nach Abb. 3 B in Heller et al., 2011) Relative TCF-Reportergenaktivität (Topflash) in INS-1 beta-Zellen unter Stimulation mit Exendin-4 (10 nM) und mit Exendin-4 (10 nM) und rekombinantem Wnt4 (10 ng/ml, 100 ng/ml) zusammen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen. n.s. = nicht signifikant, \* p < 0,05

# 3.12 Einfluss von endogenem Wnt4 auf die basale Proliferation von INS-1 beta-Zellen

Der Wnt-Signalweg wurde in seiner Bedeutung als wichtiger Regulator für die Proliferation von pankreatischen beta-Zellen erkannt (vgl. Kap. 1.3.4). Um die Relevanz des Wnt-Liganden Wnt4 für die basale beta-Zellproliferation zu untersuchen, wurde die Expression von endogenem Wnt4 in INS-1 beta-Zellen durch die Transfektion mit drei spezifischen siRNA-Sequenzen herunter reguliert. In Vorversuchen zeigte sich eine für alle drei Sequenzen gemittelte auf etwa 29 % verminderte mRNA- und Proteinexpression von Wnt4 unter spezifischem Knockdown im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (vgl. Kap. 2.2.13).

Die basale Proliferationsrate unter Wnt4-Knockdown wurde mit Hilfe der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die Zellen ermittelt. Die mit RNase-freiem Wasser und serumfreiem RPMI-Medium behandelten Kontrollen dienten als Referenz für die Angabe der relativen Proliferationswerte der INS-1 beta-Zellen der im Folgenden beschrieben Proben. Aus

Abb. 3.12.1 geht hervor, dass der Wnt4-spezifische Knockdown bei der Verwendung jeder der drei verschiedenen siRNA-Sequenzen zu einer signifikanten Abnahme der INS-1 beta-Zellproliferation geführt hat. Die basale Proliferation war für die in der Abbildung als Nr. 1, 2 und 3 benannten spezifischen Wnt4-siRNA-Sequenzen in entsprechender Reihenfolge auf  $36,20 \pm 4,12 \%$ ,  $48,79 \pm 7,76 \%$  und  $51,26 \pm 9,11 \%$  im Vergleich zu den Referenzkontrollen vermindert. Die geringen Abnahmen der gemessenen Proliferation der Zellen durch die Behandlung mit dem Transfektionsreagenz und der unspezifischen siRNA waren statistisch nicht signifikant (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.12.1** (modifiziert nach Abb. 4 B in Heller et al., 2011) Relative INS-1 beta-Zellproliferation unter Wnt4-spezifischem Knockdown mittels drei verschiedener siRNA-Sequenzen (spezifische Wnt4-siRNA Nr. 1, 2 und 3) im Vergleich zur Referenzkontrolle. Die Stimulationen mit dem Transfektionsreagenz und der unspezifischen siRNA zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Die dargestellten Mittelwerte + SD ergaben sich aus fünf voneinander unabhängigen durchgeführten Versuchen. n.s. = nicht signifikant, \* p < 0,05

# 3.13 Expression von Zyklin D1 unter Wnt4-Knockdown in INS-1 beta-Zellen

Da der spezifische Knockdown von endogenem Wnt4 zu einer signifikanten Abnahme der basalen Proliferationsrate von INS-1 beta-Zellen geführt hatte, sollte nun der Ein-

fluss des Wnt4-Knockdowns auf die Expression des Zellzyklusregulators Zyklin D1 gemessen werden. Unter dem bereits beschriebenen Knockdown von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen mittels der drei spezifischen siRNA-Sequenzen zeigte sich im Vergleich zu der Referenzkontrolle keine Veränderung der Expression von Zyklin D1. Die Stimulationen mit dem Transfektionsreagenz allein und mit der unspezifischen siRNA hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression des untersuchten Zellzyklusregulators (vgl. Abb. 3.13.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.13.1** (modifiziert nach Abb. 4 C in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expression von Zyklin D1 in INS-1 beta-Zellen unter Wnt4-spezifischem Knockdown mittels drei verschiedener siRNA-Sequenzen (spezifische Wnt4-siRNA Nr. 1, 2 und 3) und unter Behandlung mit Transfektionsreagenz und unspezifischer siRNA allein im Vergleich zur Referenzkontrolle. Die dargestellten Mittelwerte + SD ergaben sich aus drei voneinander unabhängigen durchgeführten Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.

# 3.14 Wirkung von Wnt4 auf die Insulingenexpression und die Insulinsekretion von primären murinen Langerhans'schen Inseln

Da der Wnt-Signalweg als wichtiger Regulator für die Insulinsekretion erkannt worden ist (vgl. Kap. 1.3.4), sollte die Wirkung von Wnt4 auf die Insulinbildung und -sekretion in pankreatischen beta-Zellen untersucht werden. Dazu wurden primäre Langerhans'sche Inseln von zwei Monate alten C57BL/6-Mäusen in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit auf-

steigender Glukosekonzentration (2,75, 5,5, 11, 22, 28 mM) kultiviert und zugleich mit rekombinantem Wnt4 (100 ng/ml) stimuliert. Nach drei und nach 24 Stunden wurden die Überstände für die Insulinkonzentrationsmessung entnommen. Die pankreatischen Inseln wurden nach 24 Stunden zur Messung der relativen Expressionen des Insulin-II-Gens verwendet. Die Insulinkonzentration der einzelnen Überstände wurde anhand von Insulin-Radioimmunoassays bestimmt.

Die Expression des Insulin-II-Gens der untersuchten pankreatischen Inseln stieg erwartungsgemäß mit steigender Glukosekonzentration an. Es stellte sich heraus, dass die Zugabe von rekombinantem Wnt4 im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen keinen signifikanten Effekt auf die Regulation der Insulingenexpression hatte (vgl. Abb. 3.14.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.14.1** (modifiziert nach Abb. 6 in Heller et al., 2011) Relative mRNA-Expressionen von Insulin II in primären murinen Langerhans'schen Inseln in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration des verwendeten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers über einen Stimulationszeitraum von 24 Stunden. Weiße Säulen stehen für die mit 100 ng/ml rekombinantem Wnt4, schwarze Säulen für die mit dem Lösungsmittel PBS behandelten pankreatischen Inseln. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei voneinander unabhängigen Versuchen, wobei die C<sub>t</sub>-Werte jeder Probe in Dreifachbestimmung ermittelt wurden.

Vergleichend ergaben die Auswertungen der Insulin-Radioimmunoassays, dass die Insulinkonzentrationen in den Überständen der pankreatischen Inseln mit steigenden Glukosekonzentrationen zunahmen. Dies war sowohl nach drei als auch nach 24 Stunden Stimulationszeit festzustellen. Die Stimulation mit Wnt4 hatte jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf die Insulinkonzentration in Relation zu den jeweiligen Kontrollen (vgl. Abb. 3.14.2) (Heller et al., 2011).



**Abb. 3.14.2** (modifiziert nach Abb. 7 in Heller et al., 2011) Insulinkonzentrationen der Überstände von primären Langerhans'schen Inseln der Maus unter Stimulation mit rekombinantem Wnt4 (100 ng/ml) in aufsteigenden Glukosekonzentrationen nach einer Inkubationszeit von drei und 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von drei voneinander unabhängigen Versuchen.

#### 4 Diskussion

### 4.1 Exendin-4 verstärkt die Expression von Wnt4 in pankreatischen beta-Zellen

Während der letzten Jahre konnte in verschiedenen Studien eine zentrale Rolle des Wnt-Signalwegs für die beta-Zellphysiologie festgestellt werden. Große Aufmerksamkeit auf dem Gebiet der Diabetesforschung wurde dem Wnt-Signalweg zuteil, als bestimmte Polymorphismen einzelner Nukleotide innerhalb des Gens für TCF7L2, einem Wnt-regulierten Transkriptionsfaktor, die bisher bekannte stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 zeigten. Bisher ist noch nicht geklärt, wie diese Polymorphismen, welche innerhalb von Intronregionen lokalisiert sind, zu der Entwicklung von Diabetes mellitus beitragen können. In Studien konnte gezeigt werden, dass die GLP-1-induzierte Insulinsekretion in Trägern der Risikoallele reduziert ist und dass die Polymorphismen die GLP-1-Wirkung auf die beta-Zellen modulieren können.

Um die Funktion von TCF7L2 und dem kanonischen Wnt-Signalweg besser zu verstehen, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien durchgeführt. Unter Stimulation mit exogenen Wnt-Liganden von beta-Zelllinien und murinen und humanen beta-Zellen konnte *in vitro* eine Regulation der Proliferation und des Zellzyklus durch den kanonischen Wnt-Signalweg gefunden werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Störungen innerhalb des kanonischen Wnt-Signalwegs zu fehlerhafter Glukoseinduzierter Insulinsekretion aus beta-Zellen führt.

Obwohl die Expression wichtiger Wnt-Signalkomponenten in murinen und humanen beta-Zellen gezeigt wurde, ist bis heute noch wenig über die Regulation ihrer endogenen Expression bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exendin-4 die Expression von Wnt-4 in INS-1 beta-Zellen und in primären Langerhans'schen Inseln der Maus auf RNA- und auf Proteinebene verstärkte. Exendin-4 hatte keinen Einfluss auf die Expression der Wnt-Signalmoleküle Wnt10b, Frizzled-4, LRP5 und TCF7L2. Die anderen Antidiabetika wie Rosiglitazon, Tolbutamid, Metformin und Insulin führten ebenfalls nicht zu einer Veränderung der Expression der getesteten Wnt-Signalmoleküle. Die Stimulation mit niedrigen, mittleren und hohen Glukosekonzentrationen zeigte keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Wnt-Signalmoleküle nach 24 Stunden und unter Langzeitstimulation über einen Zeitraum von vier Wochen (Heller et al., 2011). Der Anstieg der Wnt4-Expression unter Stimulation mit Exendin-4 war konzentrationsabhängig und zeigte sich am stärksten ab 10 nM Exendin-4. Die Expression von Wnt4 begann auf mRNA-Ebene nach ca. vier Stunden signifikant zu steigen und erreichte nach ca. 24 Stunden ein Maximum. Die erhöhte Expression von Wnt4 unter Stimulation mit Exendin-4 blieb über eine Stimulationszeit von vier Wochen konstant und war nicht von der Glukosekonzentration abhängig. Die Kultivierung der INS-1 beta-Zellen mit L-Zell-konditioniertem Medium, in dem das von den intestinalen L-Zellen sezernierte GLP-1 enthalten war, führte auch zu einer signifikanten Steigerung der Wnt4-Expression in INS-1 beta-Zellen. Die Hemmbarkeit der verstärkten Wnt4-Expression durch den GLP-1-Rezeptorantagonisten Exendin-(9-39) zeigt auf, dass sowohl Exendin-4 als auch das von den L-Zellen sezernierte GLP-1 über den G-Protein-gekoppelten GLP-1-Rezeptor ihre expressionsmodulierenden Effekte auf den Wnt-Liganden Wnt4 ausüben (Heller et al., 2011).

### 4.2 Exendin-4 inhibiert die Wnt-Liganden-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen

Da Exendin-4 zu einer verstärkten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und zu einer verstärkten Expression von Wnt4 in beta-Zellen führt, wurde untersucht, ob Wnt4 den kanonischen Wnt-Signalweg in beta-Zellen aktivieren kann. Die Versuche mittels transienter Transfektion von INS-1 beta-Zellen mit dem Topflash-Plasmid machten jedoch deutlich, dass Wnt4 den kanonischen Wnt-Signalweg in INS-1 beta-Zellen in den getesteten Konzentrationen nicht aktiviert. Die Stimulation mit Wnt3a, einem Wnt-Liganden, der in verschiedenen Zellsystemen, so auch in beta-Zellen, den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert (Krutzfeldt et al., 2010; Rulifson et al., 2007), führte erwartungsgemäß zu einer verstärkten TCF-abhängigen Expression des Plasmid-Reportergens. Wnt4 konnte jedoch diese Wnt3a-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs signifikant inhibieren. Die Stimulation mit Exendin-4 führte zu einer starken Aktivierung der TCF-abhängigen Reportergentranskription auf über das Dreifache der Basalrate. Die Zugabe von Wnt4 in aufsteigender Konzentration hatte keinen signifikanten Effekt auf die Exendin-4-vermittelte Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Heller et al., 2011).

Unter Benutzung des TCF-Reportergen-Assays hatten Liu und Habener bereits GLP-1 und das Analogon Exendin-4 als Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs in pan-
kreatischen beta-Zellen identifiziert. Durch Kostimulation mit spezifischen Inhibitoren, wurde deutlich, dass die Exendin-4-vermittelte Wnt-Signalaktivitätssteigerung unabhängig von der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta verläuft, jedoch den GLP-1-Rezeptor und die Proteinkinasen A und B benötigt. Sie zeigten auf molekularer Ebene, dass Exendin-4 zu einer Phosphorylierung von beta-Catenin an Serin675 durch die Proteinkinase A führt. Unabhängig von der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta kann es so zu einer Stabilisierung und damit verstärkten transkriptionellen Aktivität von beta-Catenin kommen (Hino et al., 2005; Taurin et al., 2006).

Ergebnisse einer anderen Studie zeigten, dass die Überexpression von Wnt4 in pankreatischen beta-Zellen zu keiner Änderung in der Konzentration an zytoplasmatischem beta-Catenin führte. Die unter Stimulation mit Wnt3a erreichte Zunahme der zytoplasmatischen beta-Catenin-Konzentration wurde durch eine Überexpression von Wnt4 inhibiert. Die durch Lithiumchlorid, einem Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta, erreichte Stabilisierung von zytoplasmatischem beta-Catenin konnte durch die Überexpression von Wnt4 im Gegensatz dazu aber nicht gehemmt werden (Krutzfeldt et al., 2010).

Arbeiten zur Rolle von Wnt4 in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) zeigten ebenfalls, dass Wnt4 keinen Einfluss auf die basale kanonische Wnt-Signalaktivität hat und die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Wnt3a inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Wnt4 eine verstärkte Lokalisation von beta-Catenin an die Zellmembran von HEK-293-Zellen vermittelt wird, wodurch beta-Catenin nicht in den Nukleus translozieren und keine transkriptionsaktivierenden Komplexe mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren bilden kann (Bernard et al., 2008).

Die beschriebenen Studien zur beta-Zelle zeigen jedoch, dass Wnt4 die Wnt-Rezeptorliganden-vermittelte Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, aber nicht die intrazellulären Aktivierungswege des Wnt-Signals z. B. durch Lithiumchlorid auf der Ebene der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta und durch Exendin-4 auf der Ebene von beta-Catenin inhibieren kann (Heller et al., 2011; Krutzfeldt et al., 2010). Daher ist es wahrscheinlich, dass Wnt4 in pankreatischen beta-Zellen als Antagonist des Wnt-Signalwegs auf Rezeptorebene wirkt. Wie genau der antagonisierende Wirkmechanismus ist, bleibt spekulativ. Einerseits ist es möglich, dass Wnt4 mit Wnt3a um die Bindungsstelle eines kanonischen Wnt-Rezeptors konkurriert, jedoch als Antagonist an diesem Rezeptor nicht zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führt (kompetitive Hemmung). Andererseits ist es denkbar, dass Wnt4 über nicht-kanonische Wnt-Signalwege zu einer intrazellulären Hemmung der Wnt3a-vermittelten kanonischen Wnt-Signalaktivierung führt. Wnt4 könnte durch Bindung an Frizzled-Rezeptoren aber auch an Wnt-Rezeptoren, die nicht zur Frizzled-Familie gehören, wie z. B. Ror2, zur Aktivierung dieser nicht-kanonischen Wnt-Signalwege führen (Sethi et al., 2010) (vgl. Abb. 4.2.1 b).

In anderen Zellsystemen wurden bereits Rezeptoren identifiziert, über die Wnt4 und Wnt3a ihre Effekte auf Zielzellen ausüben. So wurde gezeigt, dass Wnt3a durch Bindung an Frizzled-1 zu einer Aktivierung des TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs führt (Golan et al., 2004) und Wnt-4 seine Wirkungen auf die Zielzellen sowohl über Frizzled-1 (Tsaousi et al., 2011) als auch über Frizzled-6 (Lyons et al., 2004) ausüben kann. Eine Kompetition zwischen Wnt4 und Wnt3a um die Bindung am Frizzled-1-Rezeptor an der pankreatischen beta-Zelle wäre hierdurch vorstellbar (vgl. Abb. 4.2.1. a). Dass die Inhibition der Wnt3a-vermittelten Wnt-Signalaktivierung unter allen angewendeten Konzentrationen von Wnt4 vergleichbar war, kann durch einen nahezu vollständigen Rezeptorbesatz bereits bei niedrigster Konzentration und einer höheren Affinität von Wnt4 zum Rezeptor gelegen haben.

Für Wnt4 ist bereits beschrieben worden, dass es zu einem intrazellulären Anstieg von Kalzium führt und so über nicht-kanonische Wnt-Signalwege Effekte auf Zielzellen ausüben kann (Kuhl, 2004). Frizzled-6 wäre ein möglicher Rezeptor, über den Wnt4 durch nicht-kanonische Wnt-Signalwege zu einer intrazellulären Inhibition der kanonischen Wnt-Signalaktivierung führen könnten. Es wurde gezeigt, dass der humane Frizzled-6-Rezeptor über einen intrazellulären Kalzium-abhängigen Signalweg zu einer Inhibition des Wnt3a-vermittelten Signals führen kann (Golan et al., 2004) (vgl. Abb. 4.2.1 b).

Die hier vorgestellten Daten weisen also Wnt4 als einen Antagonisten des kanonischen Wnt-Signalwegs an pankreatischen beta-Zellen aus, wobei der genaue molekulare Machanismus der Hemmung weiterer Studien bedarf.



**Abb. 4.2.1** Mögliche Inhibierungswege der kanonischen Wnt-Signalaktivität durch Wnt4: **a)** Wnt4 und Wnt3a konkurrieren um die Bindung am Frizzled-1-Rezeptorkomplex. Die Bindung von Wnt4 führt jedoch im Gegensatz zu Wnt3a nicht zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs.

**b)** Die Bindung von Wnt4 an den Frizzled-6-Rezeptor führt über nicht-kanonische, Kalzium-abhängige Signalwege zur Inhibierung der kanonischen Wnt-Signalwegaktivierung durch intrazelluläre Hemmung des Wnt3a-Frizzled-1-Rezeptorkomplexes. Die Bindung von Wnt4 an Nicht-Frizzled-Wnt-Rezeptoren, wie z. B. Ror2, kann ebenfalls über in diesem Kontext bisher noch nicht bekannte Signalwege (gekennzeichnet durch: ?) zur intrazellulären Inhibierung des Wnt3a-Frizzled-1-Rezeptorkomplexes führen.

# 4.3 Physiologische Bedeutung von Wnt4 als Modulator der kanonischen Wnt-Signalaktivität in pankreatischen beta-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Wnt4 besonders stark in Langerhans'schen Inseln der Maus exprimiert wird und dass seine Expression unter Insulinresistenz und Hyperinsulinämie *in vivo* erhöht ist (Krutzfeldt et al., 2010). Dies lässt auf eine wichtige Rolle von Wnt4 für die beta-Zellphysiologie schließen. Im Einklang mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Wnt4 den kanonischen Wnt-Signalweg in beta-Zellen antagonisieren kann. Doch welche Bedeutung hat dies für die beta-Zellfunktion ?

Eine interessante Hypothese in diesem Zusammenhang ist, dass Wnt4 die Responsivität von beta-Zellen auf exogene Wnt-Liganden moduliert. Diese könnten einerseits von Nachbarzellen sezerniert werden, worauf die schon zahlreich nachgewiesene Expression von Wnt-Signalmolekülen sowohl im endokrinen als auch im exokrinen pankreatischen Gewebe schließen lässt, und andererseits von peripheren Geweben, wie z. B. dem Fettgewebe (Schinner et al., 2007). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg in beta-Zellen durch von Adipozyten sezernierte Stoffe aktiviert werden kann (Schinner et al., 2008). Wnt-Signalmoleküle konnten auch bereits im peripheren Blut von Menschen nachgewiesen werden, wie z. B. der Wnt-Antagonist Dickkopf-1, der zumindest zum Teil von Adipozyten gebildet wird (Gustafson et al., 2010).

Auch Adipozyten in direkter Nachbarschaft mit den Inseln könnten parakrine Effekte auf die beta-Zellen über den Wnt-Signalweg ausüben. So ist in der New-Zealand-Obese-Maus, einem Modell für Adipositas, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, eine starke Zunahme der Anzahl intrapankreatischer Adipozyten in unmittelbarer Nachbarschaft zu den pankreatischen Inseln im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt worden (Ulgen et al., 2008). Das in beta-Zellen exprimierte Wnt4 könnte also die Wnt-Signal-Responsivität der beta-Zellen und auch der benachbarten Zellen auf auto-, para- oder endokrin wirkende Stimuli modulieren.

In der Arbeit von Krützfeldt und Stoffel wurde in den pankreatischen Langerhans'schen Inseln der adipösen und insulinresistenten ob/ob-Mäuse und in gesunden Wildtyp-Mäusen keine endogene Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs gefunden. Gleichzeitig lag in den pankreatischen Inseln der adipösen ob/ob-Maus eine erhöhte Expression von Wnt4 vor. Wnt4 könnte als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer solchen fehlenden endogenen Wnt-Signalaktivität führen (Krutzfeldt et al., 2010). Für die Untersuchungen wurden pankreatischen Inseln von Mäusen in einem Alter von etwa neun Wochen verwendet. Die detektierte Wnt-Signalinaktivität muss jedoch nicht unbedingt für alle Lebenszeitpunkte der adulten beta-Zelle repräsentativ sein. Es ist denkbar, dass ähnlich wie in der sich entwickelnden pränatalen beta-Zelle es auch in adulten beta-Zellen auf die genaue zeitliche Regulation der Wnt-Signalaktivität ankommt. Die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs könnte sich abhängig von den jeweiligen metabolischen Anforderungen modulieren lassen. Ob eine andauernde Inaktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs im insulinresistenten Zustand an der Entwicklung eines Diabetes mellitus beteiligt ist, ist bisher noch nicht geklärt (Schinner, 2010).

#### 4.4 Wnt4 als Regulator der pankreatischen beta-Zellmasse

Das in den pankreatischen Inseln der adipösen und insulinresistenten ob/ob-Maus verstärkt exprimierte Wnt4 könnte neben seiner antagonisierenden Wirkung auf die kanonische Wnt-Signalaktivierung auch davon unabhängige Funktionen für die beta-Zelle übernehmen. Ein Knockdown von Wnt4 in INS-1 beta-Zellen führte wie im Ergebnisteil dargestellt zu einer signifikanten Abnahme der basalen Proliferation der beta-Zellen im Mittel auf 45 % im Vergleich zu Kontrollen (Heller et al., 2011). Wnt4 scheint also für die beta-Zellproliferation eine wichtige Rolle zu spielen. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass die pankreatischen Inseln der ob/ob-Mäuse schon ab einem Alter von vier Wochen hyperplastisch sind und ihre Größe im Laufe der Zeit zunimmt (Lindstrom, 2007; Tomita et al., 1992). Das in den pankreatischen Inseln der ob/ob-Maus verstärkt exprimierte Wnt4 könnte eine regulatorische Funktion bezüglich der Expansion und Aufrechterhaltung der beta-Zellmasse ausüben und somit einem Adaptationsmechanismus angehören, durch den sich die beta-Zellen an den jeweils aktuellen metabolischen Zustand des Organismus anpassen können. Da der Knockdown von Wnt4 keinen Einfluss auf die Expression des Zyklin D1-Gens hatte, einem Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs (Liu et al., 2008; Rulifson et al., 2007), könnte dies darauf hindeuten, dass Wnt4 über die noch kaum erforschten nicht-kanonischen Wnt-Signalwege proliferative Effekte auf die beta-Zellen ausübt. Hiermit vergleichbare Ergebnisse zeigte eine andere Studie, in der Wnt4 keine Expressionsverstärkung von kanonischen Wnt-Zielgenen wie c-Myc und Zyklin D1 bewirkte, sondern über Frizzled-6 und nicht-kanonische JNK-abhängige intrazelluläre Prozesse zu einer Expansion von hämatopoetischen Progenitorzellen führte (Heinonen et al., 2011) (vgl. Abb. 4.4.1).

Wnt4 könnte auch durch eine verminderte Apoptoserate zu einer Erhaltung der beta-Zellmasse beitragen. Da GLP-1 zu einer verstärkten Expression von Wnt4 in beta-Zellen führt und beta-Zellen vor Zytokin-vermittelte Zellschädigung schützt (Li et al., 2005; Li et al., 2003), könnten die antiinflammatorischen Wirkungen von GLP-1 zumindest partiell durch Wnt4 vermittelt werden. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass das in primären murinen Inselzellen exprimierte Zytokin TNFalpha, welches zur beta-Zellapoptose führen kann (Ishizuka et al., 1999), nicht nur durch Exendin-4 sondern auch durch Stimulation mit Wnt4 in seiner Expression vermindert wird. Auf molekularer Ebene wurde eine verminderte transkriptionelle Aktivität von AP-1, einem wichtigen Regulator der TNFalpha-Expression (Novotny et al., 1998; Rhoades et al., 1992), unter Exendin-4-Stimulation gefunden (vgl. Abb. 4.4.1) (Heller et al., 2011).



**Abb. 4.4.1** Mögliche Mechanismen der Wirkung von Wnt4 auf den Erhalt der beta-Zellmasse über nicht-kanonische Wnt-Signalwege in der pankreatischen beta-Zelle: Wnt4 führt entweder durch Bindung an Frizzled-Rezeptoren, wie z. B. Frizzled-6, über JNKabhängige Signalwege oder durch Bindung an Nicht-Frizzled-Rezeptoren über bisher noch nicht bekannte intrazelluläre Signalwege (gekennzeichnet durch: ?) zu einer gesteigerten beta-Zellproliferation und/oder verminderten beta-Zellapoptose durch Veränderung der Genexpression.

# 4.5 Wirkung von Wnt4 auf die Insulinexpression und Insulinsekretion von pankreatischen beta-Zellen

In verschiedenen Studien konnte eine wichtige Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Insulinsekretion von beta-Zellen gezeigt werden (Schinner et al., 2007). Risikoallelträger der TCF7L2-Genpolymorphismen zeigen eine reduzierte GLP-1 induzierte Insulinsekretion (Pilgaard et al., 2009; Schafer et al., 2007). Ein Knockdown von TCF7L2 führte zu einem reduziertem Effekt von GLP-1 auf Glukose-stimulierte Insulinsekretion (Shu et al., 2008). Da Exendin-4 als GLP-1-Analogon zu einer Expressionsverstärkung von Wnt4 in beta-Zellen führte, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Wnt-4 einen Einfluss auf die Insulinexpression und -sekretion hat. Die Stimulation der primären murinen beta-Zellen für drei und 24 Stunden mit aufsteigender Glukosekonzentration führte zwar erwartungsgemäß zu einer Zunahme der Insulinexpression und Insulinsekretion, jedoch hatte die Zugabe von Wnt4 keinen zusätzlichen Effekt auf diese (Heller et al., 2011). Unter Berücksichtigung der Wirkung von Wnt4 auf die beta-Zellproliferation ist jedoch eine Zunahme der absolut gemessenen Insulinproduktion der mit Wnt4 behandelten Inseln im Vergleich zu den Kontrollen nach längerer Stimulationsdauer denkbar.

#### 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Stimulation mit dem GLP-1-Rezeptoragonisten Exendin-4 die Expression von Wnt4 in pankreatischen beta-Zellen erhöht. Die Wnt-Signalmoleküle Wnt10b, Frizzled-4, LRP5 und TCF7L2 wurden in ihrer Expression nicht durch Stimulation mit Exendin-4 beeinflusst. Die Stimulationen der INS-1 beta-Zellen sowohl mit den Antidiabetika Rosiglitazon, Tolbutamid, Metformin und Insulin als auch mit den verschiedenen Glukosekonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Wnt-Signalmoleküle. Es konnte gezeigt werden, dass Wnt4 als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs in pankreatischen beta-Zellen agiert. Wnt4 hatte keinen Effekt auf die Insulinexpression und Insulinsekretion, wurde jedoch als neuer Regulator der beta-Zellproliferation identifiziert. Daher könnte GLP-1 seine proliferationsfördernden Effekte auf pankreatische beta-Zellen zum Teil durch die verstärkte Expression von Wnt4 ausüben, welches zu einer Modulation des Wnt-Signalwegs in beta-Zellen führen kann (Heller et al., 2011).

### 6 Literaturverzeichnis

- 1. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF: Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143:3152-3161, 2002
- 2. Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L: Genetics of type 2 diabetes. *Clin.Chem.* 57:241-254, 2011
- 3. Alarcon C, Wicksteed B, Rhodes CJ: Exendin 4 controls insulin production in rat islet beta cells predominantly by potentiation of glucose-stimulated proinsulin biosynthesis at the translational level. *Diabetologia* 49:2920-2929, 2006
- 4. American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1:S64-S71, 2012
- 5. Arakawa M, Ebato C, Mita T, Hirose T, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H: Effects of exendin-4 on glucose tolerance, insulin secretion, and beta-cell proliferation depend on treatment dose, treatment duration and meal contents. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 390:809-814, 2009
- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-178, 1992
- 7. Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP: Insulin signaling and life span. *Pflugers Arch.* 459:301-314, 2010
- 8. Baggio LL, Drucker DJ: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157, 2007
- 9. Bergman RN, Finegood DT, Kahn SE: The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur.J.Clin.Invest* 32 Suppl 3:35-45, 2002
- Bernard P, Fleming A, Lacombe A, Harley VR, Vilain E: Wnt4 inhibits betacatenin/TCF signalling by redirecting beta-catenin to the cell membrane. *Biol.Cell* 100:167-177, 2008
- 11. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R: A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225-230, 1996
- 12. Bonner-Weir S: Islet growth and development in the adult. *J.Mol.Endocrinol.* 24:297-302, 2000
- 13. Brubaker PL, Drucker DJ: Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 145:2653-2659, 2004
- Brubaker PL, Schloos J, Drucker DJ: Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology* 139:4108-4114, 1998

- 15. Brunk CF, Simpson L: Comparison of various ultraviolet sources for fluorescent detection of ethidium bromide-DNA complexes in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 82:455-462, 1977
- 16. Burke JP, Williams K, Gaskill SP, Hazuda HP, Haffner SM, Stern MP: Rapid rise in the incidence of type 2 diabetes from 1987 to 1996: results from the San Antonio Heart Study. *Arch.Intern.Med.* 159:1450-1456, 1999
- 17. Burke MA, Mutharasan RK, Ardehali H: The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel. *Circ.Res.* 102:164-176, 2008
- 18. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 25:169-193, 2000
- 19. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW: Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J.Mol.Endocrinol.* 34:597-601, 2005
- 20. Buteau J, El Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M: Glucagonlike peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia* 47:806-815, 2004
- 21. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabe-tes* 52:102-110, 2003a
- 22. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC: Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52:2304-2314, 2003b
- 23. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE: Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat.Med.* 11:183-190, 2005
- 24. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS: Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia* 50:63-67, 2007
- Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, Kuo SS, Lee KC, Chiu KC, Chuang LM: Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes* 56:2631-2637, 2007
- 26. Chen J, Yu L, Wang L, Fang X, Li L, Li W: Stability of synthetic exendin-4 in human plasma in vitro. *Protein Pept.Lett.* 14:19-25, 2007
- Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ: The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat.Rev.Endocrinol.* 8:228-236, 2012
- 28. Cho YM, Kieffer TJ: New aspects of an old drug: metformin as a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) enhancer and sensitiser. *Diabetologia* 54:219-222, 2011

- 29. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC: Islet amyloid, increased A-cells, reduced Bcells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 9:151-159, 1988
- 30. da Silva Xavier G, Loder MK, McDonald A, Tarasov AI, Carzaniga R, Kronenberger K, Barg S, Rutter GA: TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* 58:894-905, 2009
- 31. Dabernat S, Secrest P, Peuchant E, Moreau-Gaudry F, Dubus P, Sarvetnick N: Lack of beta-catenin in early life induces abnormal glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 52:1608-1617, 2009
- Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, Mitchell BD, Shuldiner AR: Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes* 55:2654-2659, 2006
- 33. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A: Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25:4-7, 2004
- 34. Day C: Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet.Med.* 16:179-192, 1999
- 35. De A: Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. *Acta Bio-chim.Biophys.Sin.(Shanghai)* 43:745-756, 2011
- 36. DeFronzo RA: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med.Clin.North Am.* 88:787-835, ix, 2004
- DeFronzo RA, Barzilai N, Simonson DC: Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 73:1294-1301, 1991
- Del Prato S, Tiengo A: The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res.Rev.* 17:164-174, 2001
- Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C, Capeau J: Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene* 20:252-259, 2001
- 40. Dessimoz J, Bonnard C, Huelsken J, Grapin-Botton A: Pancreas-specific deletion of beta-catenin reveals Wnt-dependent and Wnt-independent functions during development. *Curr.Biol.* 15:1677-1683, 2005
- 41. Ding VW, Chen RH, McCormick F: Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J.Biol.Chem.* 275:32475-32481, 2000

- 42. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N: Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of Psammomys obesus during development of diabetes. *Diabetes* 48:738-744, 1999
- 43. Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T: Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J.Mol.Med.* 81:455-470, 2003
- 44. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-46, 2004
- 45. Drucker DJ, Lee YC, Asa SL, Brubaker PL: Inhibition of pancreatic glucagon gene expression in mice bearing a subcutaneous glucagon-producing GLUTag transplantable tumor. *Mol.Endocrinol.* 6:2175-2184, 1992
- 46. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF: Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:3434-3438, 1987
- 47. Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J: Expression of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43:1165-1169, 2000
- 48. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li CS, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R: Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144:5149-5158, 2003
- 49. Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE: Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 50:1021-1029, 2001
- Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D: TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N.Engl.J.Med.* 355:241-250, 2006
- 51. Frayling TM: Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat.Rev.Genet.* 8:657-662, 2007
- 52. Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:229-234, 2003
- 53. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O: Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N.Engl.J.Med.* 348:383-393, 2003

- 54. Gilsbach R, Kouta M, Bonisch H, Bruss M: Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques* 40:173-177, 2006
- 55. Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A: The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J.Biol.Chem.* 279:14879-14888, 2004
- 56. Gordon MD, Nusse R: Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J.Biol.Chem.* 281:22429-22433, 2006
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K: Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 38:320-323, 2006
- 58. Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M: [Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus]. *Rev.Med.Interne* 24:730-737, 2003
- 59. Gustafson B, Eliasson B, Smith U: Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. *Diabetologia* 53:536-540, 2010
- 60. Hardie DG: Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am.J.Clin.Nutr.* 93:891S-6, 2011
- 61. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW: AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J.Physiol* 574:7-15, 2006
- Hayashi T, Iwamoto Y, Kaku K, Hirose H, Maeda S: Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia* 50:980-984, 2007
- 63. Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosl J, Perreault C: Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS.One.* 6:e19279, 2011
- Heller C, Kuhn MC, Mulders-Opgenoorth B, Schott M, Willenberg HS, Scherbaum WA, Schinner S: Exendin-4 upregulates the expression of Wnt-4, a novel regulator of pancreatic beta-cell proliferation. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 301:E864-E872, 2011
- 65. Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, Miller C, Wong G, Madsen OD, Serup P: Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev.Dyn.* 225:260-270, 2002
- Heller RS, Klein T, Ling Z, Heimberg H, Katoh M, Madsen OD, Serup P: Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas. *Gene Expr.* 11:141-147, 2003

- 67. Herder C, Roden M: Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. *Eur.J.Clin.Invest* 41:679-692, 2011
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A: Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol.Cell Biol.* 25:9063-9072, 2005
- Holloway GP, Thrush AB, Heigenhauser GJ, Tandon NN, Dyck DJ, Bonen A, Spriet LL: Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 292:E1782-E1789, 2007
- 70. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T: A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50:747-751, 2007
- 71. Hui H, Wright C, Perfetti R: Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50:785-796, 2001
- 72. Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A: Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* 131:1165-1173, 1992
- 73. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 5th Edition: 38, 2011.
- 74. Ishizuka N, Yagui K, Tokuyama Y, Yamada K, Suzuki Y, Miyazaki J, Hashimoto N, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A: Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic beta cells. *Metabolism* 48:1485-1492, 1999
- 75. Jin T: The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 51:1771-1780, 2008
- Kahn SE: Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86:4047-4058, 2001
- 77. Kahn SE: The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46:3-19, 2003
- 78. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846, 2006
- 79. Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S: Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am.J.Hum.Genet.* 75:832-843, 2004
- Kieffer TJ, Habener JF: The glucagon-like peptides. *Endocr.Rev.* 20:876-913, 1999

- Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, Castaigne JP, Robitaille MF, Jette L, Benquet C, Drucker DJ: Development and characterization of a glucagon-like peptide 1albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. *Diabetes* 52:751-759, 2003
- Klip A, Guma A, Ramlal T, Bilan PJ, Lam L, Leiter LA: Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. *Endocrinology* 130:2535-2544, 1992
- Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU: Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv.Synth.Pathol.Res.* 4:110-125, 1985
- Kozka IJ, Holman GD: Metformin blocks downregulation of cell surface GLUT4 caused by chronic insulin treatment of rat adipocytes. *Diabetes* 42:1159-1165, 1993
- 85. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR: Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 2:1300-1304, 1987
- Krutzfeldt J, Stoffel M: Regulation of wingless-type MMTV integration site family (WNT) signalling in pancreatic islets from wild-type and obese mice. *Diabetologia* 53:123-127, 2010
- 87. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.* 27:95-125, 2006
- 88. Kuhl M: The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci.* 9:967-974, 2004
- 89. Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatei MA, Withers DJ, Gardiner JV, Bailey CJ, Bloom SR: Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J.Clin.Invest* 100:2729-2736, 1997
- Lee SH, Demeterco C, Geron I, Abrahamsson A, Levine F, Itkin-Ansari P: Islet specific Wnt activation in human type II diabetes. *Exp.Diabetes Res.* 2008:728763, 2008
- 91. Lee YC, Asa SL, Drucker DJ: Glucagon gene 5'-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 267:10705-10708, 1992
- Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HE, Duggirala R, Blangero J, Goring HH, Stern MP: Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes* 56:389-393, 2007
- 93. Lencioni C, Lupi R, Del Prato S: Beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Curr.Diab.Rep.* 8:179-184, 2008

- Li L, El Kholy W, Rhodes CJ, Brubaker PL: Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B. *Diabetologia* 48:1339-1349, 2005
- 95. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ: Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J.Biol.Chem.* 278:471-478, 2003
- 96. Lindstrom P: The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal.* 7:666-685, 2007
- 97. Liu Z, Habener JF: Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 283:8723-8735, 2008
- 98. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM: Trend in the prevalence of the metabolic syndrome and its impact on cardiovascular disease incidence: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 29:625-630, 2006
- 99. Luttman W., Bratke K., Küpper M., and Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. 3: 112-115, 2009b. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- 100. Luttman W., Bratke K., Küpper M., and Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. 3: 212, 2009a. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- 101. Lyons JP, Mueller UW, Ji H, Everett C, Fang X, Hsieh JC, Barth AM, McCrea PD: Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp.Cell Res.* 298:369-387, 2004
- 102. Lyssenko V: The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 11:385-392, 2008
- Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ: Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptoralpha in mice. *Diabetologia* 54:339-349, 2011
- 104. Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, Ciani S, Messeri G, Rotella CM: Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 24:489-494, 2001
- 105. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C: LDL-receptorrelated protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321-325, 2001
- 106. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S: Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:5535-5541, 2004
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F: An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul.Pept.* 146:4-11, 2008

- Mark, M. Sulfonylharnstoffe und Glinide: Vom Chemotherapeutikum zum Antidiabetikum. 31(3): 252-262, 2002. Pharmazie in unserer Zeit, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- 109. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM: Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11:30, 2012
- 110. Marzi C, Huth C, Kolz M, Grallert H, Meisinger C, Wichmann HE, Rathmann W, Herder C, Illig T: Variants of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. *Horm.Metab Res.* 39:46-52, 2007
- 111. Matthaei S, Bierwirth R, Fritsche A, Gallwitz B, Haring HU, Joost HG, Kellerer M, Kloos C, Kunt T, Nauck M, Schernthaner G, Siegel E, Thienel F: Medical antihyperglycaemic treatment of type 2 diabetes mellitus: update of the evidence-based guideline of the German Diabetes Association. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 117:522-557, 2009
- 112. Matthaei S, Greten H: Evidence that metformin ameliorates cellular insulinresistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane. *Diabete Metab* 17:150-158, 1991a
- 113. Matthaei S, Hamann A, Klein HH, Benecke H, Kreymann G, Flier JS, Greten H: Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes* 40:850-857, 1991b
- 114. Matthaei S, Hamann A, Klein HH, Benecke H, Kreymann G, Flier JS, Greten H: Evidence that metformin increases insulin-stimulated glucose transport by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters from an intracellular pool to the cell surface in rat adipocytes. *Horm.Metab Res.Suppl* 26:34-41, 1992
- 115. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS: New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 2:20-21, 1964
- 116. McLin VA, Rankin SA, Zorn AM: Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 134:2207-2217, 2007
- 117. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57:1584-1594, 2008
- 118. Meier JJ, Kayed R, Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Jayasinghe S, Langen R, Glabe CG, Butler PC: Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent betacell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 291:E1317-E1324, 2006
- 119. Mikels AJ, Nusse R: Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25:7461-7468, 2006

- 120. Mülhardt, C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6: 264-267, 2009b. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- 121. Mülhardt, C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6: 134-138, 2009a. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- 122. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350, 1987
- 123. Murao K, Li J, Imachi H, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, Tokumitsu H: Exendin-4 regulates glucokinase expression by CaMKK/CaMKIV pathway in pancreatic beta-cell line. *Diabetes Obes.Metab* 11:939-946, 2009
- 124. Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H: Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 41:257-264, 1998
- 125. Murtaugh LC: The what, where, when and how of Wnt/beta-catenin signaling in pancreas development. *Organogenesis.* 4:81-86, 2008
- 126. Mussig K, Staiger H, Machicao F, Haring HU, Fritsche A: Genetic variants affecting incretin sensitivity and incretin secretion. *Diabetologia* 53:2289-2297, 2010
- Naito K, Skog S, Tribukait B, Andersson L, Hisazumi H: Cell cycle related [3H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet.* 20:447-457, 1987
- 128. Natali A, Ferrannini E: Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* 49:434-441, 2006
- 129. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29:46-52, 1986
- Nauck MA, Baller B, Meier JJ: Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S190-S196, 2004
- 131. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W: Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J.Clin.Invest* 91:301-307, 1993
- Neumiller JJ: Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J.Am.Pharm.Assoc.(2003.)* 49 Suppl 1:S16-S29, 2009
- 133. Novotny V, Prieschl EE, Csonga R, Fabjani G, Baumruker T: Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF alpha promoter in stimulated mast cells. *Nucleic Acids Res.* 26:5480-5485, 1998

- Nusse R, Varmus HE: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31:99-109, 1982
- O'Rahilly S, Turner RC, Matthews DR: Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N.Engl.J.Med.* 318:1225-1230, 1988
- 136. Ovalle F, Bell DS: Clinical evidence of thiazolidinedione-induced improvement of pancreatic beta-cell function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes.Metab* 4:56-59, 2002
- 137. Ovalle F, Bell DS: Effect of rosiglitazone versus insulin on the pancreatic betacell function of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:2585-2589, 2004
- 138. Owen MR, Doran E, Halestrap AP: Evidence that metformin exerts its antidiabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem.J.* 348 Pt 3:607-614, 2000
- 139. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB: The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature* 286:82-84, 1980
- 140. Pan QR, Li WH, Wang H, Sun Q, Xiao XH, Brock B, Schmitz O: Glucose, metformin, and AICAR regulate the expression of G protein-coupled receptor members in INS-1 beta cell. *Horm.Metab Res.* 41:799-804, 2009
- 141. Papadopoulou S, Edlund H: Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 54:2844-2851, 2005
- 142. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM: Thiazolidinediones block tumor necrosis factoralpha-induced inhibition of insulin signaling. *J.Clin.Invest* 100:1863-1869, 1997
- 143. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM: Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 141:4600-4605, 2000
- 144. PfaffI MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45, 2001
- 145. Pfutzner A, Forst T: Elevated intact proinsulin levels are indicative of Beta-cell dysfunction, insulin resistance, and cardiovascular risk: impact of the antidiabetic agent pioglitazone. *J.Diabetes Sci.Technol.* 5:784-793, 2011
- 146. Phielix E, Szendroedi J, Roden M: The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. *Trends Pharmacol.Sci.* 32:607-616, 2011
- 147. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS: Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47:358-364, 1998

- 148. Pilgaard K, Jensen CB, Schou JH, Lyssenko V, Wegner L, Brons C, Vilsboll T, Hansen T, Madsbad S, Holst JJ, Volund A, Poulsen P, Groop L, Pedersen O, Vaag AA: The T allele of rs7903146 TCF7L2 is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic glucose production in young healthy men. *Diabetologia* 52:1298-1307, 2009
- 149. Poitout V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr.Rev.* 29:351-366, 2008
- 150. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, Galloway JA, Frank BH, Karrison T, Van Cauter E: Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J.Clin.Invest* 81:435-441, 1988a
- 151. Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E: Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J.Clin.Invest* 81:442-448, 1988b
- 152. Pradhan AD, Manson JE, Meigs JB, Rifai N, Buring JE, Liu S, Ridker PM: Insulin, proinsulin, proinsulin:insulin ratio, and the risk of developing type 2 diabetes mellitus in women. *Am.J.Med.* 114:438-444, 2003
- Prager R, Schernthaner G, Graf H: Effect of metformin on peripheral insulin sensitivity in non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabete Metab* 12:346-350, 1986
- 154. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC: Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 10 Suppl 4:32-42, 2008
- 155. Reimann F, Dabrowski M, Jones P, Gribble FM, Ashcroft FM: Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of beta-cell and cardiac ATPsensitive K+ (K(ATP)) channels by Mg-nucleotides. *J.Physiol* 547:159-168, 2003
- 156. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM: Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8:532-539, 2008
- 157. Rhoades KL, Golub SH, Economou JS: The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J.Biol.Chem.* 267:22102-22107, 1992
- 158. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50:649-657, 1987
- Roden M: Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes-pathogenesis and clinical relevance. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* 2:335-348, 2006
- Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB: The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 283:E745-E752, 2002

- Rosenbaum SE, Greenberg AS: The short- and long-term effects of tumor necrosis factor-alpha and BRL 49653 on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma2 gene expression and other adipocyte genes. *Mol.Endocrinol.* 12:1150-1160, 1998
- 162. Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, ten Berge D, Chen H, Gu X, Taketo MM, Nusse R, Hebrok M, Kim SK: Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:6247-6252, 2007
- Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH: Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulindependent diabetes. *Lancet* 1:1356-1359, 1989
- 164. Saito K, Yaginuma N, Takahashi T: Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tohoku J.Exp.Med.* 129:273-283, 1979
- 165. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S: Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45:85-96, 2002
- 166. Sale MM, Smith SG, Mychaleckyj JC, Keene KL, Langefeld CD, Leak TS, Hicks PJ, Bowden DW, Rich SS, Freedman BI: Variants of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in an African-American population enriched for nephropathy. *Diabetes* 56:2638-2642, 2007
- 167. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson BK, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S: Genomewide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331-1336, 2007
- 168. Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, Holst JJ, Dekker JM, 't Hart LM, Nijpels G, van Haeften TW, Haring HU, Fritsche A: Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* 50:2443-2450, 2007
- 169. Schinner S: Wingless-type MMTV integration site family (WNT) signalling in pancreatic beta cells-more complex than expected. *Diabetologia* 53:2073-2075, 2010
- 170. Schinner S, Dellas C, Schroder M, Heinlein CA, Chang C, Fischer J, Knepel W: Repression of glucagon gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through inhibition of Pax6 transcriptional activity. *J.Biol.Chem.* 277:1941-1948, 2002

- 171. Schinner S, Kratzner R, Baun D, Dickel C, Blume R, Oetjen E: Inhibition of human insulin gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and thiazolidinedione oral antidiabetic drugs. *Br.J.Pharmacol.* 157:736-745, 2009a
- 172. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A: Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet.Med.* 22:674-682, 2005
- 173. Schinner S, Ulgen F, Papewalis C, Schott M, Woelk A, Vidal-Puig A, Scherbaum WA: Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51:147-154, 2008
- 174. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA: Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int.J.Obes.(Lond)* 31:864-870, 2007
- Schinner S, Willenberg HS, Schott M, Scherbaum WA: Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease. *Eur.J.Endocrinol.* 160:731-737, 2009b
- 176. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Jeneson JA, Backes WH, van Echteld CJ, van Engelshoven JM, Mensink M, Schrauwen P: Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. *Diabetologia* 50:113-120, 2007
- 177. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M: A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316:1341-1345, 2007
- 178. Sethi JK, Vidal-Puig A: Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Bio-chem.J.* 427:1-17, 2010
- 179. Sharma RP, Chopra VL: Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster. *Dev.Biol.* 48:461-465, 1976
- Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, Cho JH, McIntosh CH, Maedler K: Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Hum.Mol.Genet.* 18:2388-2399, 2009
- 181. Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K: Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 57:645-653, 2008

- 182. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885, 2007
- 183. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J, Efstratiadis A: RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol.Cell Biol.* 5:2090-2103, 1985
- Song WJ, Schreiber WE, Zhong E, Liu FF, Kornfeld BD, Wondisford FE, Hussain MA: Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in beta-cell proliferation. *Diabetes* 57:2371-2381, 2008
- 185. Souza SC, Yamamoto MT, Franciosa MD, Lien P, Greenberg AS: BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor-alpha: a potential new insulinsensitizing mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 47:691-695, 1998
- 186. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741-748, 2000
- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE: Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 333:550-554, 1995
- Sun J, Jin T: Both Wnt and mTOR signaling pathways are involved in insulinstimulated proto-oncogene expression in intestinal cells. *Cell Signal*. 20:219-229, 2008
- 189. Sun J, Wang D, Jin T: Insulin alters the expression of components of the Wnt signaling pathway including TCF-4 in the intestinal cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1800:344-351, 2010
- 190. Talchai C, Lin HV, Kitamura T, Accili D: Genetic and biochemical pathways of beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 11 Suppl 4:38-45, 2009
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-535, 2000
- 192. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO: Phosphorylation of betacatenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 281:9971-9976, 2006
- 193. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ: Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86:3717-3723, 2001
- 194. Tomita T, Doull V, Pollock HG, Krizsan D: Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). *Pancreas* 7:367-375, 1992

- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8:1224-1234, 1994a
- 196. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156, 1994b
- 197. Tsaousi A, Williams H, Lyon CA, Taylor V, Swain A, Johnson JL, George SJ: Wnt4/beta-catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening. *Circ.Res.* 108:427-436, 2011
- U. K. prospective diabetes study 16: Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44:1249-1258, 1995
- 199. Ulgen F, Scherbaum WA, Partke HJ, Bornstein SR, Schinner S: Intrapancreatic adipocyte deposition in a mouse model of the metabolic syndrome. *Horm.Metab Res.* 40:507-509, 2008
- 200. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R: Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci.Signal.* 1:re9, 2008
- 201. van Amerongen R, Nusse R: Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136:3205-3214, 2009
- 202. Villareal DT, Robertson H, Bell GI, Patterson BW, Tran H, Wice B, Polonsky KS: TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* 59:479-485, 2010
- 203. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ: Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:609-613, 2001
- 204. Wajchenberg BL: beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr.Rev.* 28:187-218, 2007
- 205. Walter H, Lubben G: Potential role of oral thiazolidinedione therapy in preserving beta-cell function in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65:1-13, 2005
- 206. Waring MJ: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J.Mol.Biol.* 13:269-282, 1965
- 207. Weir GC, Bonner-Weir S: Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S16-S21, 2004
- 208. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1:S154-S159, 2001
- 209. Welters HJ, Kulkarni RN: Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol.Metab* 19:349-355, 2008

- 210. White J: Efficacy and safety of incretin based therapies: clinical trial data. *J.Am.Pharm.Assoc.(2003.)* 49 Suppl 1:S30-S40, 2009
- 211. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J: IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 94:311-321, 2011
- 212. Widen EI, Eriksson JG, Groop LC: Metformin normalizes nonoxidative glucose metabolism in insulin-resistant normoglycemic first-degree relatives of patients with NIDDM. *Diabetes* 41:354-358, 1992
- 213. Winder WW, Hardie DG: AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am.J.Physiol* 277:E1-10, 1999
- 214. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: Exendin-4 stimulates both betacell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270-2276, 1999
- 215. Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Yamazaki K, Kira K, Saeki T, Tanaka I: Enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 by biguanide compounds. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 298:779-784, 2002
- 216. Yi F, Brubaker PL, Jin T: TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J.Biol.Chem.* 280:1457-1464, 2005
- 217. Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T: Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 149:2341-2351, 2008
- 218. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S: Selective betacell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88:2300-2308, 2003
- 219. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT: Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336-1341, 2007
- 220. Zeyda M, Stulnig TM: Obesity, inflammation, and insulin resistance--a minireview. *Gerontology* 55:379-386, 2009
- 221. Zhou J, Pineyro MA, Wang X, Doyle ME, Egan JM: Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J.Cell Physiol* 192:304-314, 2002

## 7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01. Januar 2013, Charlotte Heller

Unterschrift