

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

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

Regulation der Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs in intestinalen  
endokrinen L-Zellen durch metabolische und pharmakologische Stimuli

Dissertation

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

vorgelegt von  
Moritz Broja  
2016

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referentin/Referent:

Koreferentin/Koreferent:

**Für meine Familie**

# Zusammenfassung

## Fragestellung und Ziele

Der kanonische Wnt-Signalweg spielt in der Regulation der Expression des Proglucagon-Gens (*Gcg*) eine wichtige Rolle. *Gcg* kodiert in intestinalen endokrinen L-Zellen für das Inkretinhormon *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Dieses ist mit dem anderen Inkretinhormon, *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP), bis zu 70% für die Ausschüttung von Insulin verantwortlich, was als „Inkretin-Effekt“ bezeichnet wird.

Bisher war jedoch nicht bekannt, inwieweit die Expression von endogenen Wnt Signalmolekülen in L-Zellen durch pharmakologische und metabolische Stimuli reguliert wird.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die Hypothese untersucht, ob hohe Glukosekonzentrationen und ausgewählte Glukose senkende Substanzen einen Effekt auf die Expression von Wnt Signalmolekülen in endokrinen intestinalen L-Zellen haben.

## Methodik

Hierzu wurden murine GLP-1 produzierende GLUTag Zellen, stellvertretend für humane  $\delta$ -Zellen, einerseits mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (5.5 mM, 11 mM, 16.7 mM und 25 mM) und andererseits mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose senkenden Substanzen (Exendin-4, Insulin, Metformin, Rosiglitazon und Tolbutamid) 24 Stunden lang stimuliert. Die Quantifizierung der Expression von Wnt Signalmolekülen wurde mittels quantitativer *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untersucht.

## Ergebnisse und Diskussion

Bezogen auf eine Konzentration von 5.5 mM Glukose führte eine Stimulation mit höheren Glukosekonzentrationen in murinen GLUTag Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Expression der Wnt Signalmoleküle, Wnt4 und TCF7L2. Nach 24 Stunden wurde die Wnt4 Expression bei einer Stimulation von 11, 16.7 und 25 mM Glukose um 21%, 55% und 61% gehemmt (bezogen auf 5 mM Glukose).

Die Expression von TCF7L2 wurde nach 24 Stunden Stimulation mit Glukosekonzentrationen von 11, 16.7 und 25 mM um 26%, 36% und 46% inhibiert (bezogen auf 5 mM Glukose).

Es konnte kein regulatorischer Effekt auf die Expression von Wnt4 und TCF7L2 nach der Behandlung mit den verschiedenen Glukose senkenden Substanzen gezeigt werden.

### **Schlussfolgerung**

Diese Daten zeigen, dass hohe Glukosekonzentrationen die endogene Wnt4 und TCF7L2 mRNA-Expression in intestinalen endokrinen L-Zellen hemmen. Da Wnt Signalmoleküle Regulatoren der GLP-1 Expression sind, könnte dies einen Mechanismus für die verminderte GLP-1 Sekretion aus intestinalen L-Zellen bei chronischer Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AMPK</b>	AMP-aktivierte Proteinkinase
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>CAP</b>	Cbl-associated Protein
<b>Cbl</b>	Casitas B-lineage Lymphoma
<b>cDNA</b>	Complementary Deoxyribonucleic Acid
<b>CK-1<math>\alpha</math></b>	Casein Kinase-1 $\alpha$
<b>CM</b>	Control Medium
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DDG</b>	Deutsche Diabetes Gesellschaft
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DPP-4</b>	Dipeptidyl-Peptidase-4
<b>Dvl</b>	Dishevelled
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent Assay
<b>EMA</b>	Europäische Arzneimittelagentur
<b>FCCM</b>	Fat Cell-Conditioned Medium
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>Fz</b>	Frizzled
<b>Gcg</b>	Proglukagon-Gen
<b>GIP</b>	Gastric Inhibitory Polypeptide / Glucose-dependend Insulinotropic Polypeptide
<b>GIPR</b>	GIP-Rezeptor
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like Peptide-1
<b>GLP-1R</b>	Glucagon-like Peptide-1 Rezeptor
<b>GLP-2</b>	Glucagon-like Peptide-2
<b>GLUT</b>	Glukosetransporter
<b>GRP</b>	Gastric-releasing Polypeptide
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$
<b>HbA1c</b>	Hämoglobin A1c
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation

<b>IR</b>	Insulinrezeptor
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KI</b>	Kontraindikation
<b>LAR</b>	Luciferase Assay Reagent
<b>LEF</b>	Lymphoid enhancer-binding factor
<b>LRP</b>	Low-density lipoprotein receptor-related protein
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein
<b>o.g.</b>	Obengenannt
<b>oGTT</b>	Oraler Glukosetoleranztest
<b>PC 1/3</b>	Prohormon Convertase 1/3
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PI-3-K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PKB</b>	Protein Kinase B
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor $\alpha$
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor $\gamma$
<b>rpm</b>	Rounds per minute
<b>s.c.</b>	Subcutan
<b>s.u.</b>	Siehe unten
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>TCF</b>	T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor
<b>TF</b>	TopFlash-Plasmid
<b>TG</b>	Triglyzeride
<b>UKPDS</b>	United Kingdom Prospective Diabetes Study
<b>UV</b>	Unverträglichkeit
<b>Wg</b>	Wingless

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Diabetes mellitus</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition, Klassifikation und Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	3
1.1.3	Glukose senkende Substanzen	4
1.1.3.1	Biguanide – Metformin	6
1.1.3.2	Sulfonylharnstoffe – Tolbutamid	6
1.1.3.3	Thiazolidindione – Rosiglitazon	7
1.1.3.4	Insulin	7
1.2	<b>Inkretine</b>	<b>8</b>
1.2.1	Definition	8
1.2.2	Geschichte	10
1.2.3	Inkretin-Hormone	12
1.2.3.1	GIP	12
1.2.3.2	GLP-1	12
1.2.4	GLP-1 basierte Therapien	14
1.3	<b>Wnt-Signalweg</b>	<b>15</b>
1.3.1	Geschichte	15
1.3.2	Wnt-Signalweg im Überblick	16
1.3.3	Der kanonische Wnt-Signalweg	17
1.3.4	Der Wnt-Signalweg und die intestinalen endokrinen L-Zellen	19
1.4	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1.1	Reagenzien	23
2.1.2	Medien	24
2.1.3	Lösungen, Puffer und Medium	25
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.5	Geräte	27
2.2	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1	Zellkultur GLUTag Zellen	28
2.2.2	Herstellung von Fat cell-conditioned Medium (FCCM)	29
2.2.3	Transiente Transfektion von GLUTag Zellen	30
2.2.4	Stimulation von GLUTag Zellen	33
2.2.4.1	Stimulation mit Glukose	34
2.2.4.2	Stimulation mit oralen Glukose senkenden Substanzen	34
2.2.5	RNA-Extraktion aus GLUTag Zellen	35
2.2.5.1	Photometrische Messung der RNA-Konzentration	36
2.2.6	cDNA Reverse Transkription	36
2.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.8	Statistische Analyse	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	<b>Aktivierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalweges in GLUTag Zellen</b>	<b>45</b>
3.2	<b>Wirkung von rekombinantem Wnt3a auf ein TCF-Reportergen in GLUTag-Zellen</b>	<b>47</b>
3.3	<b>Stimulierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalwegs durch FCCM</b>	<b>48</b>
3.4	<b>Regulation der mRNA-Expression von Wnt-Signalmolekülen durch unterschiedliche Konzentrationen von verschiedenen Glukose senkenden Substanzen in GLUTag-Zellen</b>	<b>49</b>
3.5	<b>Regulation der mRNA-Expression von Wnt-Signalmolekülen durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>



<b>6</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>70</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Definition, Klassifikation und Epidemiologie

Der Diabetes mellitus wird definiert als eine Störung des Stoffwechsels, dem eine chronische Hyperglykämie als Leitbefund zugrunde liegt. Die Ursache liegt entweder in einer gestörten Insulinsekretion oder einer gestörten Insulinwirkung. Beide Störungen können ebenfalls zusammen vorliegen [1].

Der Diabetes mellitus verzeichnete in den letzten Jahrzehnten einen erheblichen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz. Laut der *International Diabetes Federation* (IDF) lag die Prävalenz der Erkrankung im Jahre 2011 bei 366 Millionen. Eine Schätzung besagt, dass 2030 die Prävalenz auf 552 Millionen steigen wird [2].

Die chronische Hyperglykämie führt über die Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Augen, Nieren und dem Nervensystem. Diese können in einer Erblindung oder Nierenversagen ihren Endpunkt haben. Über die Makroangiopathie kommt es vorwiegend zu Folgeerkrankungen an Herz, Gehirn und peripheren Arterien. Die Inzidenz für kardiovaskuläre, periphere arterielle Erkrankungen und Apoplex ist stark erhöht [1].

Aufgrund der epidemiologischen Entwicklung und der wirtschaftlichen Folgen ist der Diabetes bereits jetzt eines der führenden Gesundheitsprobleme der heutigen Gesellschaft [3].

Bei der Einteilung des Diabetes werden verschiedene Typen unterschieden:

Der Diabetes mellitus Typ 1 zeichnet sich durch eine zellvermittelte autoimmune Destruktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas aus. Hieraus resultiert ein absoluter Insulinmangel. Symptome der Erstmanifestation dieser Erkrankung können eine Bewusstseinsbeeinträchtigung oder ein Schwächegefühl sein, die durch das Vorliegen einer Ketoazidose zustande kommen. Zusätzliche Symptome wie eine Polyurie und Polydipsie sind weitere klinische Merkmale. Das Vorkommen dieser ersten Form liegt unter Diabetikern bei 5 – 10% [1].

Der Diabetes mellitus Typ 1 wird in der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt.

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist charakterisiert durch eine erworbene und/oder vererbte Insulinsekretionsstörung und eine Insulinresistenz. Er tritt häufig bei Adipösen im fortgeschrittenen Alter auf. Diese Form des Diabetes ist mit ca. 90% aller Diabetiker die Häufigste [1].

Verschiedene Ursachen sind für den Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich.

Zu erwähnen sind nicht-genetische Ursachen in Form eines Bevölkerungswachstums, einer zunehmenden Lebenserwartung und einer frühzeitig diagnostizierten Erkrankung im Rahmen der optimierten medizinischen Versorgung [4]. Umwelteinflüsse und Änderungen des Lebensstils wie körperliche Inaktivität und der daraus resultierenden Adipositas sind weitere Faktoren [5]. 60% aller Diabetesfälle können mit einer Gewichtszunahme in Verbindung gebracht werden [6].

Bei genetischen Veränderungen können die Beeinträchtigungen auf vielen verschiedenen Genen verteilt sein. Zum einen gibt es Gene für die Insulinsekretion und zum anderen Gene für die Insulinsensitivität [1]. Der Einfluss genetischer Faktoren für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 wurde in Zwillingsstudien untersucht. Hier wurde bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanz für einen Diabetes mellitus Typ 2 von 41 – 55%, bei Dizygoten von 10 – 15% nachgewiesen [7].

Mittlerweile sind viele Genloci bekannt, die mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung stehen. Den häufigsten Beitrag zur Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 liefert der bekannteste Genlocus – das TCF7L2. Dieser kodiert für einen Wnt-regulierten Transkriptionsfaktor, der die  $\beta$ -Zell-Entwicklung und -Funktion beeinflusst. Personen mit diesem veränderten Transkriptionsfaktor haben ein um 40% höheres Risiko, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln [4]. In früheren Studien wurden verschiedene Polymorphismen im TCF7L2-Gen nachgewiesen. Diese befinden sich als *Single-nucleotide polymorphism's* (SNP's) in den Introns 3 und 4 der für TCF7L2 kodierenden Region [8-10]. Der genaue Einfluss der SNP's auf die Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist bisher nicht bekannt [11]. Die beschriebenen SNP's in TCF7L2 sind jedoch mit einer gestörten Insulinsekretion assoziiert [12].

Auf die Ursache anderer Diabetesformen, wie z.B. genetische Defekte der  $\beta$ -Zellfunktion oder Erkrankungen des exokrinen Pankreas bei Typ I Diabetes sowie auf

den Gestationsdiabetes, soll hier nicht eingegangen werden.

### 1.1.2 Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

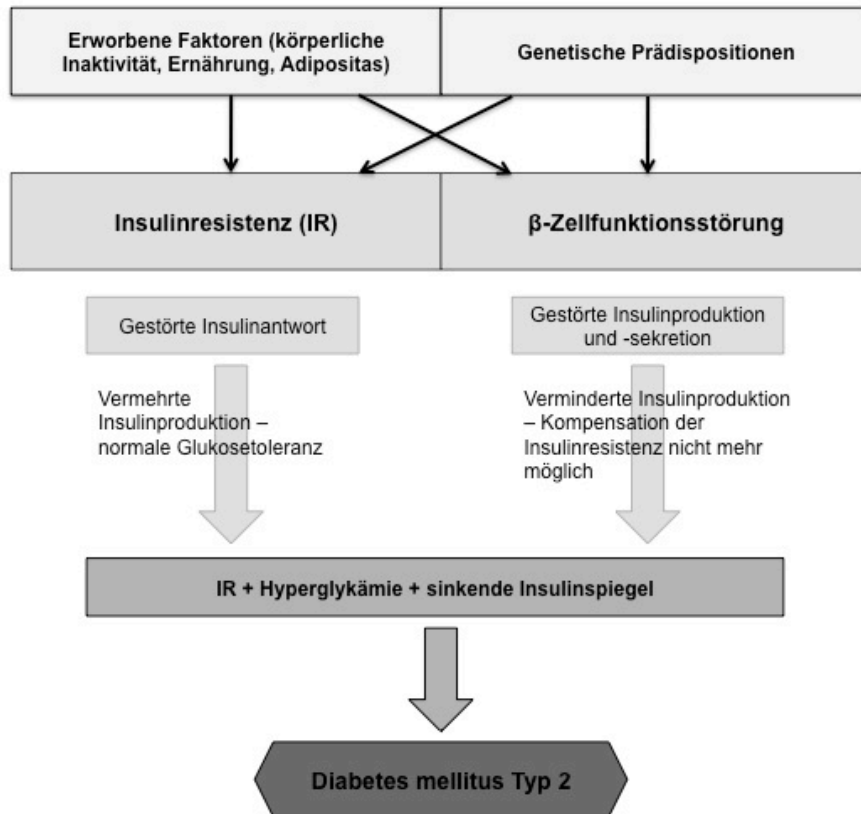
Dem Diabetes mellitus Typ 2 liegen zwei pathophysiologische Ursachen zu Grunde. Einerseits besteht in der Regel eine Insulinresistenz, wobei die Zellen des Körpers nicht mehr adäquat auf das Hormon Insulin reagieren. Andererseits kommt es zu Störungen bei der Insulinausschüttung der  $\beta$ -Zellen [1]. Diese sogenannte  $\beta$ -Zell-Dysfunktion bezeichnet eine inadäquate Insulinausschüttung mit unzureichender Senkung postprandial erhöhter Blutglukosespiegel.

Sowohl die Insulinresistenz, als auch die  $\beta$ -Zell-Dysfunktion, führen zu einem Verlust der Insulinwirkung.

Die zunächst erhöhte körpereigene Insulinproduktion kann die herabgesetzte Insulinsensitivität nur begrenzt kompensieren. Langfristig kommt es aufgrund der progredienten Insulinresistenz sowie der abnehmenden Sekretionsleistung der  $\beta$ -Zellen zu einem Ungleichgewicht der Glukosehomöostase. Es wird angenommen, dass eine Dysfunktion der Insulinzielzellen für die zunehmende Resistenz, ein Verlust der  $\beta$ -Zell-Masse und –Funktion sowie eine erhöhte Apoptoserate der  $\beta$ -Zellen für die herabgesetzte Sekretionsleistung ursächlich sind [3].

Initial kommt es zur Ausbildung eines ‚Prä-Diabetes‘. Entweder in Form einer *Impaired glucose tolerance* (IGT) oder in Form einer *Impaired fasting glucose* (IFG). Ein IGT zeichnet sich durch einen 2h-Plasmaglukose-Wert von 140 – 199 mg/dl, die IFG durch einen Nüchtern-Blutzucker-Wert von 100 – 125 mg/dl aus [13].

Bei zunehmender Dauer des Diabetes mellitus Typ 2 kommt es nach mehreren Jahren der Insulinmehrproduktion häufig zu einer unzureichenden Insulinausschüttung, wodurch langfristig exogene Insulingaben indiziert sein können [3].



**Abbildung 1:** Zusammenfassung der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2

### 1.1.3 Glukose senkende Substanzen

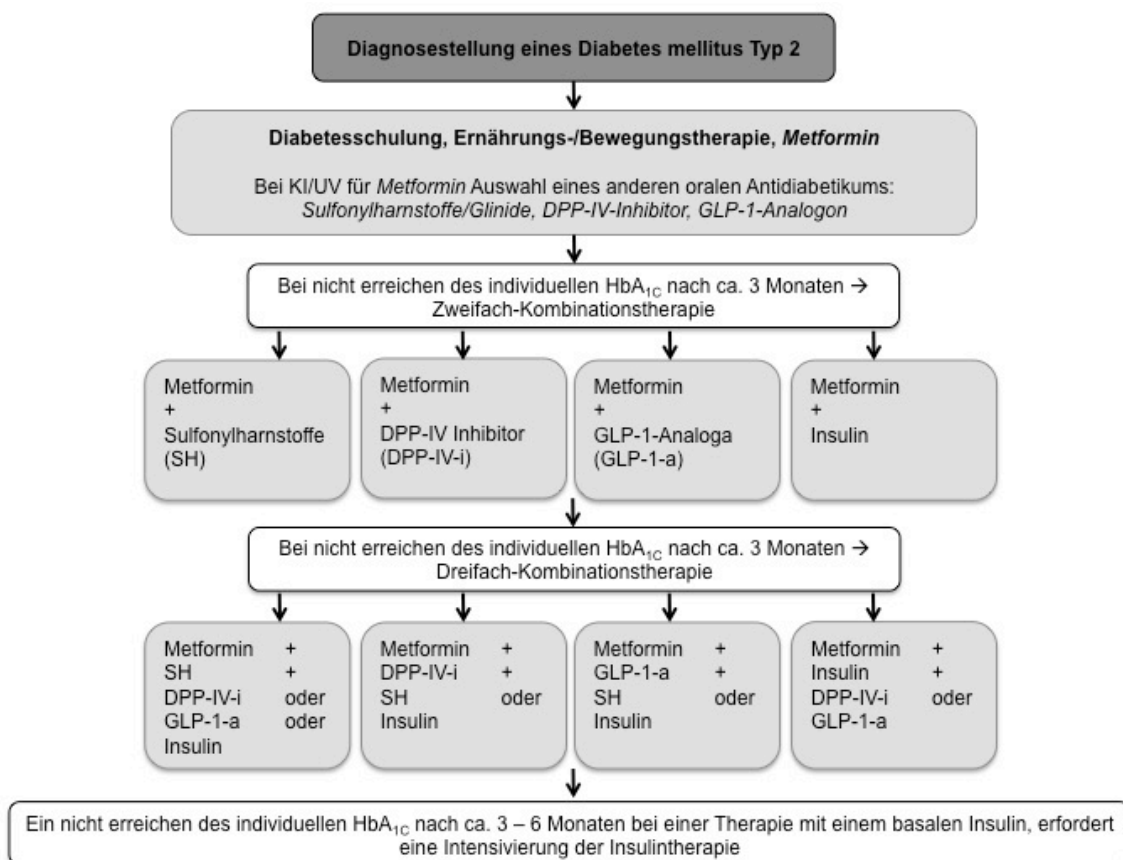
Indikation zur Therapie eines Diabetes mellitus sind ein zu hoher Blutglukose- und ein zu hoher HbA<sub>1C</sub>-Wert. Darunter ist ein Nüchternglukose-Wert von  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7.0$  mmol/l) oder ein 2h-Plasmaglukosewert von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11.1$  mmol/l) nach Durchführung eines oralen Glukosetoleranztestes (oGTT), sowie ein HbA<sub>1C</sub>-Wert von  $\geq 6.5\%$  zu verstehen, welche die Kriterien für das Vorliegen eines Diabetes mellitus darstellen.

Erst nach Ausschöpfen konservativer Maßnahmen wie einer kalorien- und fettreduzierten Ernährung, wird eine medikamentöse Behandlung des Diabetes mellitus begonnen. Diese medikamentöse Behandlung wird entweder als Mono- oder Kombinationstherapie angewandt.

Ziel der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 ist das Vermeiden von Akutkomplikationen wie das Entstehen eines hypoglykämischen oder eines hyperglykämischen Kommas und von bereits erwähnten Folgeerkrankungen.

Die Therapieziele sind zum Beispiel das Erreichen von individuell festgelegten HbA<sub>1c</sub>-Zielkorridoren, die optimale Einstellung von Cholesterin- und Triglyzeridwerten und der Prophylaxe oder Therapie einer arteriellen Hypertonie [3, 14].

Die Abbildung 2 verdeutlicht die Individualisierung der Therapieziele. Sie sind abhängig von dem Lebensalter, der Lebenserwartung, Komorbidität und den Arzneimittelnebenwirkungen jedes einzelnen Individuums [3].



**Abbildung 2:** Medikamentöse Stufentherapie des Diabetes mellitus Typ 2 nach der *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) [3, 14].

### 1.1.3.1 Biguanide – Metformin

Metformin ist seit 1950 auf dem Markt eingeführt. Es ist das Medikament der ersten Wahl zur Behandlung eines Diabetes mellitus Typ 2. Es verbessert die Insulinwirkung ohne den Insulinspiegel zu erhöhen. Metformin entfaltet seine Wirkung in der Leber und in der Muskulatur. Es reduziert die Anzahl von freien Fettsäuren, vermindert die Lipidoxidationsrate [15] und die hepatische Glukoseproduktion [16].

Metformin besitzt multiple Wirkmechanismen. Beispielsweise vermittelt es seine Wirkung über den Weg der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) [17] oder führt zu einer Signalweiterleitung über den *Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$*  (PPAR- $\alpha$ ) [18].

Metformin ist bei allen mit Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankten das Mittel der Wahl, soweit keine Kontraindikationen sowie Unverträglichkeiten gegen das Medikament vorliegen [3].

Laut der United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) liegen die Vorteile bei Metformin in der langen Erfahrung, in einer geringen Hypoglykämiegefahr, in einer fehlenden Gewichtszunahme, sowie einer Verminderung von kardiovaskulären Ereignissen [3].

Von Interesse für die vorliegende Arbeit ist eine durch Metformin vermittelte vermehrte GLP-1 Sekretion. Jedoch ist der Mechanismus der erhöhten GLP-1-Sekretion unter Metformin weiterhin unklar [19, 20].

### 1.1.3.2 Sulfonylharnstoffe – Tolbutamid

Sulfonylharnstoffe werden seit den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts angewendet. Zu ihnen gehören Substanzen wie Tolbutamid, Glibenclamid und Glimepirid.

Sulfonylharnstoffe binden an Sulfonylharnstoff-Rezeptoren, die eine Untereinheit ATP-sensitiver Kalium-Kanäle der  $\beta$ -Zelle darstellen. Nach Bindung hemmen sie den ATP-abhängigen Kalium-Kanal. Es kommt so zur Umkehr des Membranpotentials.

Dadurch strömen Calcium-Ionen in die  $\beta$ -Zelle, die eine Ausschüttung von Insulingranula bewirken [21].

Dieser Vorgang wird als  $\beta$ -zytotroper Effekt bezeichnet. Er tritt dosisabhängig, jedoch unabhängig von Hyper-, Normo- oder Hypoglykämie auf [14].

Ein Nachteil der Sulfonylharnstoffe besteht in einem häufigeren Auftreten von Hypoglykämien und in einer Zunahme des Körpergewichts [3].

#### 1.1.3.3 Thiazolidindione – Rosiglitazon

Thiazolidindione sind selektive Agonisten des *Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$*  Rezeptor (PPAR- $\gamma$ ). Diese Rezeptoren sind intrazellulär in verschiedenen Zelltypen aufzufinden. In Adipozyten sind sie in einer hohen Dichte vorhanden. Zudem sind sie in Muskel-, Leber- und  $\beta$ -Zellen nachweisbar. Thiazolidindione verbessern die Insulinsensitivität.

Trotz der positiven Stoffwechseleigenschaften sind Thiazolidindione inzwischen aufgrund der Risikozunahme von kardiovaskulären Ereignissen nicht mehr zugelassen [22].

#### 1.1.3.4 Insulin

Mit Insulin werden Patienten therapiert, die keine ausreichende endogene Insulinproduktion mehr besitzen oder bei denen das Therapieziel mit oralen Glukose senkenden Substanzen nicht erreicht werden kann [14].

Insulin führt über eine Bindung am Insulinrezeptor (IR) zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege [23].

Es gibt mindestens drei verschiedene Signalwege. Beim ersten Signalweg wird die Wirkung über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B-Signalweg (PI-3-K/PKB) vermittelt. Dieser ermöglicht die postprandiale Glukoseaufnahme in die peripheren Zellen. Zusätzlich hemmt er die hepatische Glukoneogenese, die die basale Hyperglykämie bei Typ 2 Diabetikern unterhält [24].



Der zweite Signalweg, der MAP-Kinase-Signalweg (*Mitogen-Activated Protein*) reguliert unter anderem Zellwachstum und –differenzierung.

Der dritte Signalweg, der Cbl/CAP-Signalweg führt auch zu einer Translokation von Glukosetransportern (GLUT) in die Zellmembran [23].

Anhand der 10-Jahres *Follow-Up-Studie* der UKPD-Studie von Holman et al. konnte gezeigt werden, dass Insulin einen positiven Effekt auf mikro- und makrovaskuläre Ereignisse im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 hat [25].

Mit Bezug auf die Thematik der vorliegenden Arbeit ist es erwähnenswert, dass Insulin die *Gcg* mRNA-Expression in zwei unterschiedlichen *Gcg*-produzierenden Zelllinien sowie in primären FRIC-Zellen (fötale Rattendarmzelle) stimuliert. Yi et al. konnten nach Stimulation mit Insulin in diesen Zellen eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus und eine dadurch folgende Aktivierung der *Gcg* mRNA-Expression nach Binden des  $\beta$ -Catenin/TCF4-Komplexes an den *Enhancer* G2 nachweisen. Somit kam es zum Anstieg des GLP-1 Spiegels. Dieser Effekt kam durch eine Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  zustande (s.u.) [26].

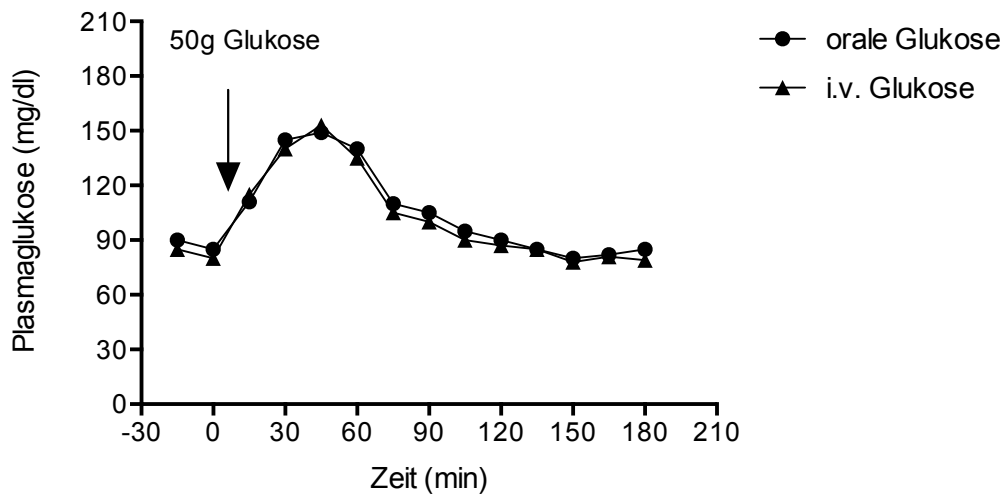
## 1.2 Inkretine

### 1.2.1 Definition

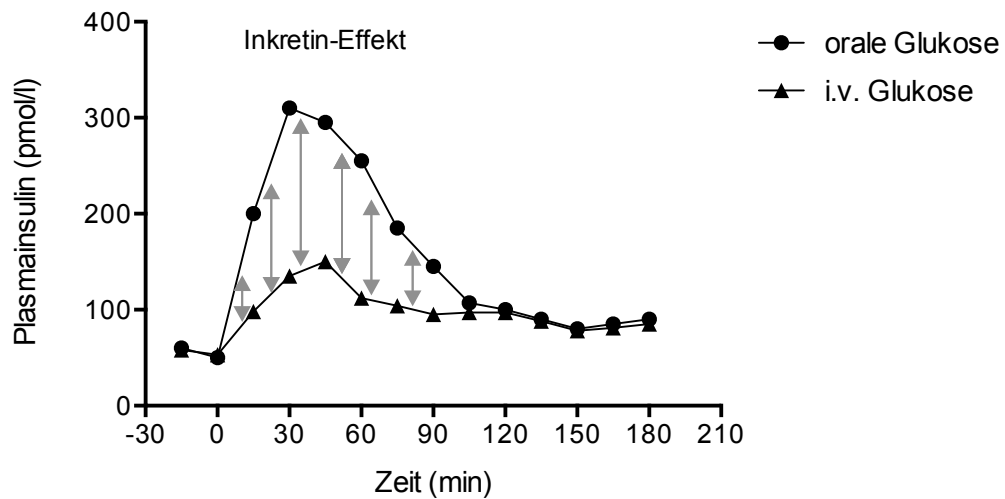
Inkretine (*intestinal secretion of insulin = incretin*) sind Peptidhormone, die nach oraler Nahrungsaufnahme von intestinalen endokrinen Zellen ausgeschüttet werden, um zur Glukosehomöostase beizutragen.

Bei adäquater Aufnahme von Glukose wird bei stoffwechselgesunden Personen nach oral versus intravenös (i.v.) aufgenommener Glukose ein höherer Insulinspiegel nach oraler Aufnahme gemessen. Diese zusätzlich intestinal gesteuerte Insulinsekretion wird als „Inkretin-Effekt“ bezeichnet (siehe Abbildung 3).

A)



B)



**Abbildung 3:** Der Inkretin-Effekt, A) zeigt die zeitliche Entwicklung der Plasmaglukose nach Aufnahme von 50g Glukose oral oder i.v., B) zeigt die unterschiedliche zeitliche Entwicklung des Plasmainsulins in Beziehung zur in Abbildung A) gezeigten Glukoseaufnahme. Abbildung adaptiert an Nauck et al. [27].

Dieser Effekt führt zur Ausschüttung von bis zu 70% des gesamten freigesetzten Insulins nach oraler Glukoseaufnahme [28].

## 1.2.2 Geschichte

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde unter dem Einfluss von Iwan P. Pawlow angenommen, dass alle physiologischen Körperfunktionen neural gesteuert werden. Diese Hypothese widerlegten William M. Bayliss und Ernest H. Starling im Jahre 1902, da sie in der intestinalen Mukosa einen Faktor fanden, der über den Blutstrom die exokrine Sekretion des Pankreas stimulierte. Sie nannten diesen Faktor Sekretin [29]. Aufgrund des Effektes von Sekretin auf den exokrinen Pankreas führte Starling den Begriff Hormon ein. Dieser definiert sich als ein chemischer Faktor, der die Funktion anderer Organe über den Blutweg beeinflusst [30].

La Barre führte 1932 den Begriff Inkretin ein. Damit beschrieb er eine Substanz, die er aus der Mukosa des oberen Darmes extrahiert hatte. Diese reduzierte Blutglukosespiegel ohne die exokrine Sekretion des Pankreas zu beeinflussen [31].

Erst 30 Jahre später wurde die Erforschung des Inkretins wieder aufgenommen, nachdem optimierte Untersuchungsverfahren wie Reinigungs- und Sequenzierungsmethoden und sensitive Radioimmunoassays zur Verfügung standen. Oral aufgenommene Glukose induziert eine signifikant höhere Insulinantwort im Gegensatz zu intravenös verabreichter Glukose. Sogar im Falle erhöhter Blutglukosespiegel bei intravenöser Gabe bestätigten sich diese Ergebnisse [32, 33].

1967 schätzten Perley und Kipnis, dass etwa 50% vom sezernierten Insulin durch jene gastrointestinale Faktoren freigesetzt wurden [34]. Dieses Phänomen wurde in den folgenden Jahren als „Entero-insulinäre Achse“ bezeichnet. Ein regulatorisches System in welchem die Sekretion von pankreatischen insulinären Hormonen unter dem partiellen Einfluss von Faktoren/Hormonen des Gastrointestinaltrakt steht [35].

Daraufhin wurden alle bis dahin bekannten gastrointestinalen Hormone als potentielle Inkretin-Kandidaten alleine oder in Kombination untersucht. Doch keines erfüllte die folgenden Kriterien eines Inkretins [36, 37]:

- Die Inkretinhormone müssen von endokrinen intestinalen Zellen nach oraler Applikation von Nahrung, vor allem in Form von Glukose, sezerniert werden
- Die freigesetzten Inkretinhormone müssen mit ihrer Konzentration, die sie nach der Nahrungsaufnahme erreichen, die Sekretion von adäquaten Insulinmengen gewährleisten können
- Das Inkretinhormon setzt Insulin nur bei erhöhten Blutglukosespiegeln frei

(Glukoseabhängigkeit)

Das erste Inkretinhormon, welches entdeckt wurde, entstammte dem Dünndarm des Schweins. Aufgrund seiner Magensäure-hemmenden Eigenschaft wurde es initial *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) genannt [38].

In folgenden Studien wurde jedoch ersichtlich, dass GIP in physiologischen Dosen als Inkretin fungierte, da es die Insulinsekretion stimulierte. Die Magensäure-hemmende Wirkung wurde nur bei pharmakologischen Dosen ersichtlich. Daher wurde das Akronym GIP in *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* umbenannt [39]. GIP stammt aus den K-Zellen des Intestinums und wird vor allem nach Aufnahme von Glukose oder Fett ausgeschüttet und potenziert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion.

Lauritsen et al. fanden 1980 heraus, dass GIP nicht alleine für den Inkretin-Effekt verantwortlich war. Selbst bei Nagetieren mit einer Immunneutralisierung der endogenen GIP Aktivität war der Inkretin-Effekt nicht erloschen. Selbst Menschen nach Ileoektomie besitzen eine verminderte Inkretinaktivität bei intakten Plasma GIP Spiegel [40].

Ende 1970 machte die rekombinante DNA Technologie solche Fortschritte, dass das fehlende Inkretin identifiziert wurde. 1983 fanden Bell et al., dass das Proglucagon-Gen der Genlocus für das noch fehlende Inkretin war [41].

Der Entdeckung des zweiten Inkretinhormon, *Glukagon-like peptide-1* (GLP-1), folgte die Klonierung und Sequenzierung von Säuger-Proglucagon-Genen und komplementären DNA's. Zusätzlich zum bereits bekannten Glukagon kodierte das Proglucagon-Gen für zwei weitere Peptide, die nahezu 50% homolog zum Glukagon waren. Daher stammt der Name *Glucagon-like peptide-1* und *Glucagon-like peptide-2* (GLP-2). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Glukagon wurden beide neuen Hormone auf einen insulinotropen Effekt untersucht. Nur GLP-1 war dazu fähig, die Insulinsekretion des Pankreas zu stimulieren [28].

### 1.2.3 Inkretin-Hormone

#### 1.2.3.1 GIP

Das menschliche GIP-Gen besteht aus 10 kb, die auf dem langen Arm des Chromosom 17 lokalisiert sind. Diese 10 kb bestehen aus 6 Exons und 5 Introns [42].

Die reife und bioaktive Form von GIP (1-42) ist eine 42-Aminosäure-Sequenz [43].

GIP (1-42) wird in den intestinalen K-Zellen synthetisiert und von diesen auch sezerniert [44]. Die Mehrheit der intestinalen K-Zellen ist im Duodenum und im proximalen Jejunum lokalisiert [45].

Die Sekretion von GIP (1-42) wird durch die Aufnahme von Glukose und Fetten stimuliert. Erste nachweisbare postprandiale Spiegel sind nach 10 – 20 min zu erkennen [46].

GIP (1-42) wird im Plasma enzymatisch inaktiviert. Die Halbwertszeit beträgt bei gesunden und an Diabetes erkrankten Personen nur 5 – 7 min [47].

GIP kann über seinen Rezeptor in Geweben wie dem zentralen Nervensystem, dem Fettgewebe, dem Knochen und natürlich den  $\beta$ -Zellen des Pankreas seine Wirkung vermitteln [28].

Der Effekt von GIP der glukose-induzierten Insulinfreisetzung machte es zu einem Kandidaten für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. Jedoch ist die insulinotrope Wirkung von GIP bei Diabetikern nahezu verloren, obwohl GIP normal oder vermehrt ausgeschüttet wird. Der Grund könnte eine verminderte GIP Rezeptor Dichte oder eine verminderte Sensitivität von  $\beta$ -Zellen auf GIP sein [48].

#### 1.2.3.2 GLP-1

Das Inkretinhormon GLP-1 wird auf dem Proglukagon-Gen (*Gcg*) kodiert. Dieses Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 2 lokalisiert. Es beinhaltet 6 Exons und 5 Introns, wobei sich die Sequenz von GLP-1 auf dem Exon 4 konzentriert [49].

Das *Gcg* wird in den  $\alpha$ -Zellen des endokrinen Pankreas, welches dort für Glukagon kodiert, und in Nervenzellen des kaudalen Hirnstammes und des Hypothalamus exprimiert. Wichtigster Bildungsort von GLP-1 sind die intestinalen endokrinen L-

Zellen, welche im distalen Jejunum, im Ileum und im Colon lokalisiert sind. Diese Zellen stehen im direkten Kontakt mit dem intestinalen Lumen.

Alle der genannten Gewebe besitzen die gleiche mRNA. Anschließend wird es in jedem einzelnen Gewebe in eine Vorstufe, das Preproglukagon, synthetisiert. Danach findet ein gewebsspezifisches „*posttranslationales Processing*“ statt [50].

Verschiedene Formen des GLP-1 werden sezerniert. Dazu gehören die wahrscheinlich *in vivo* inaktiven GLP-1 (1-37) und GLP-1 (1-36) und die 2 biologisch aktiven und gleichwertigen Formen des GLP-1. Zum einen das GLP-1 (7-36), welches die Hauptform beim Menschen darstellt, und zum anderen das mit Glycin verlängerte GLP-1 (7-37). Die biologisch aktiven Formen werden durch die PC 1/3 aus den inaktiven Stufen gebildet [51, 52].

Ebenso wie bei GIP ist bei GLP-1 die Nahrungsaufnahme, vor allem von Glukose und Fetten, der Stimulus zur Freisetzung [53]. Diese erscheint nach oraler Nahrungsaufnahme in einem zweiphasigen Muster. Es gibt eine frühe Phase (nach 10-15 min) und eine späte Phase (nach 30-60 min) der Sekretion von GLP-1 [54].

Aufgrund der distalen Dünndarmlokalisation von L-Zellen, kann die erste Phase unmöglich durch den direkten Kontakt der L-Zellen mit den Nährstoffen vermittelt werden. Diese wird durch das autonome Nervensystem, den Neurotransmittern *gastric-releasing polypeptide* (GRP) und Acetylcholin sowie durch GIP nach oraler Nährstoffaufnahme vermittelt [55, 56].

Der Spiegel von aktivem GLP-1 bei Nüchtern-Blutzucker liegt normalerweise zwischen 5 und 10 pmol/L. Dieser steigt um das zwei- bis dreifache nach Nahrungsaufnahme an [46]. Der Höchstwert des Plasmaspiegels von GLP-1 ist abhängig von der Zusammensetzung der Nahrung und der Größe der Mahlzeit [57].

Die Halbwertszeit des GLP-1 beträgt bei Gesunden und Diabetikern weniger als 2 min. Es kommt zu einem raschen Abbau durch die Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) an Position 2 des Aminoendes. Es entstehen die Metabolite GLP-1 (9-37), GLP-1 (9-36) oder GLP-1 (28-38) [58].

Die Halbwertszeit der GLP-1 Abbauprodukte ist nahezu 5 min, da diese über die Nieren ausgeschieden werden. Bei Personen mit einer Niereninsuffizienz ist die Ausscheidung der Metabolite entsprechend verzögert [59].

Die Wirkung von GLP-1 wird über den GLP-1 Rezeptor (GLP-1R) vermittelt. Dieser befindet sich in vielen Geweben wie in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -Zellen des Pankreas, Herz, Niere,

Magen und Darm und weitere. Er gehört wie der GIP-Rezeptor zur Familie der G-Protein-gekoppelten sieben-transmembrandomänen-Rezeptoren [60].

Die Wirkungen von GLP-1 konzentrieren sich hauptsächlich auf das Pankreas. Dort führt es zu einer Stärkung der Glukose-induzierten Insulinsekretion sowie zu einer vermehrten Gen-Expression von Insulin [61]. Es verhindert *in vitro* die  $\beta$ -Zell-Apoptose und vermittelt eine  $\beta$ -Zell-Neogenese [62]. Des Weiteren verzögert GLP-1 die Magenentleerung, fördert das Sättigungsgefühl und erleichtert den meist adipösen Diabetikern die Gewichtsabnahme [28].

Unbekannt und daher wichtig für die Thematik der vorliegenden Arbeit ist wie die Bildung von GLP-1 pharmakologisch reguliert werden kann.

#### 1.2.4 GLP-1 basierte Therapien

Bei Personen mit einer Glukosetoleranzstörung oder einem Diabetes mellitus Typ 2 ist der durch Nahrungsaufnahme stimulierte GLP-1 Spiegel signifikant herabgesetzt [57]. Dies ist ein Grund für das große Interesse an GLP-1 bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.

Wie bereits erwähnt, führt GLP-1 und somit eine GLP-1 basierte Therapie zu einer Erhöhung der glukoseabhängigen Insulinsekretion, bewahrt  $\beta$ -Zellen *in vitro* vor deren Apoptose, erhöht die Zelldifferenzierung dieser [63] und führt zusätzlich zu einer Gewichtsreduktion.

Bei pharmakologischer Anwendung führt die GLP-1 basierte Therapie zu einer Verbesserung der  $\beta$ -Zell-Funktion, Hemmung der Glukagonfreisetzung, Verzögerung der Magenpassage, Appetithemmung, Körpergewichtsreduzierung und Reduktion der freien Fettsäuren im Serum [64].

Aufgrund des schnellen endogenen Abbaus von GLP-1 durch DPP-IV müsste die GLP-1 basierte Therapie kontinuierlich i.v. oder subcutan (s.c.) gegeben werden. Dieses Vorgehen wäre für eine chronische Therapie jedoch nicht praktikabel. Daher wurden die Therapieoptionen wie ein DPP-IV-Inhibitor sowie GLP-1 Analoga wie das Exenatid und Liraglutid entwickelt. Diese sind resistent gegen den Abbau der physiologischen DPP-IV [65].

DPP-IV-Inhibitoren führen durch die Hemmung der DPP-IV zu einem verlängerten Effekt von GLP-1. Die Wirkung ist abhängig vom Vorkommen des endogen produzierten GLP-1. Sie können zu einer Verdopplung der GLP-1-Konzentration führen [66].

DPP-IV-Inhibitoren senken den HbA<sub>1C</sub>-Wert signifikant um ca. 0,5 – 1% (abhängig vom Ausgangs-HbA<sub>1C</sub>-Wert) und sind gewichtsneutral [67].

Es gibt zwei strukturell gleiche GLP-1-Analoga. Das natürlich vorkommende Exendin-4 und dazu synthetisch hergestellte Pendant Exenatid. Exendin-4 ist ein 39 Aminosäure langes Protein, welches aus dem Speichel der Gila-Krustenechse (*Heloderma suspectum*) gewonnen wurde [68].

GLP-1-Analoga führen zu einem signifikanten Abfall des HbA<sub>1C</sub>-Wertes. Exenatid senkt die HbA<sub>1C</sub>-Werte abhängig vom Ausgangsniveau um 0,8 bis 1,1%. Außerdem erreichen sie eine signifikante Reduktion des Körpergewichts [69-71]. Aus diesen Gründen sind sie interessant für die Therapie des Diabetes mellitus.

## 1.3 Wnt-Signalweg

### 1.3.1 Geschichte

Die Geschichte der Wnt-Forschung hat zu Beginn der 80-er Jahre ihren Ursprung. Die Bezeichnung Wnt wird aus den Begriffen Int-1 und Wg (*wingless*) gebildet. Int-1, mittlerweile Wnt-1, wurde als ein Gen entdeckt, welches bei der Integration durch *mouse mammary tumor virus* (MMTV) provirale DNA in viral induzierten Brusttumoren aktiviert wird und diese induziert [72]. Das Wg-Gen wurde im Rahmen der Experimente von *Drosophila melanogaster* entdeckt. Dieses kontrolliert die Segmentpolarität während des Larvalstadiums der Fliege [73]. 1987 wurde die Homologie zwischen Wg und Wnt-1 entdeckt [74].

Der Wnt-Signalweg wurde aus Vielzellern (Metazoa) als Signalweg konserviert. Er galt als Mittel der Verständigung unter Vielzellern und als Prozess für die Zelldifferenzierung, -proliferation, -überleben und Apoptose [75].



### 1.3.2 Wnt-Signalweg im Überblick

Im kanonischen Wnt-Signalweg sind vom Liganden bis zum Zielgen mehrere Strukturen an bzw. in die Zelle eingegliedert. Beteiligt sind die extrazellulären Rezeptorliganden (Wnt), zellmembranständige Rezeptoren mit eingeschlossen der Corezeptoren und intrazelluläre Komponenten, wie  $\beta$ -Catenin als wichtigen Regulator für die Transkription [76].

Wnt-Proteine sind sezernierte Glykoproteinliganden. Sie beinhalten ca. 300 Aminosäuren (AS), die mit 21 bis 23 Cysteinresten in einem bestimmten Muster versehen sind. Sie werden modifiziert, indem an einen Cysteinrest eine Palmitinsäurekette konjugiert wird [77]. Die Palmitinsäurekette macht das Wnt-Protein zu einem hydrophoben Glykoprotein. Diese Eigenschaft ermöglicht eine effiziente Signaltransduktion und ist wichtig für die Freisetzung von Wnt [78].

In den meisten Säugergenomen, damit eingeschlossen das humane Genom, sind 19 verschiedene Wnt-Proteine bekannt. Diese gliedern sich in zwölf Subfamilien [76]. Diese verschiedenen Wnt-Proteine besitzen unterschiedliche Aktivitäten an Liganden und Signalwege. Sie lassen sich jedoch grob in Gruppen einteilen. Eine Gruppe, die beispielsweise Wnt1 und Wnt3a beinhaltet, führte in Experimenten zur Transformation von C57MG-Zellen, einer murinen Brustepithel-Zelllinie [79]. Die andere Gruppe, mit zum Beispiel Wnt4 und Wnt5a, zeigte diesen Effekt nicht [80]. Die erstere Gruppe führte zu einem Anstieg des  $\beta$ -Catenins im Zytoplasma der Zelle, wohingegen die zweite Wnt-Gruppe  $\beta$ -Catenin unabhängig zu sein scheint.

Auf diese Einteilung geht die Unterteilung der Wnt-Signalwege in den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg zurück [81]. Der kanonische Signalweg führt über seine Liganden zu einer Anreicherung des  $\beta$ -Catenins und somit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin/TCF. Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg ist  $\beta$ -Catenin unabhängig und aktiviert Rho-GTPasen, c-Jun N-terminale Kinasen und andere Signalkaskaden [82].

Wnt-Proteine interagieren mit einem heterodimeren Rezeptorenkomplex, der aus *Frizzled* (Fz) und *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP) besteht [76].

Es sind 10 verschiedene Fz-Rezeptoren vorhanden. Alle besitzen eine sieben-transmembranöse Domäne und eine große extrazelluläre N-terminale Cystein-reiche

Domäne (CRD) [83]. Diese extrazelluläre Domäne ist ideal zur Bindung von Wnt-Proteinen [84].

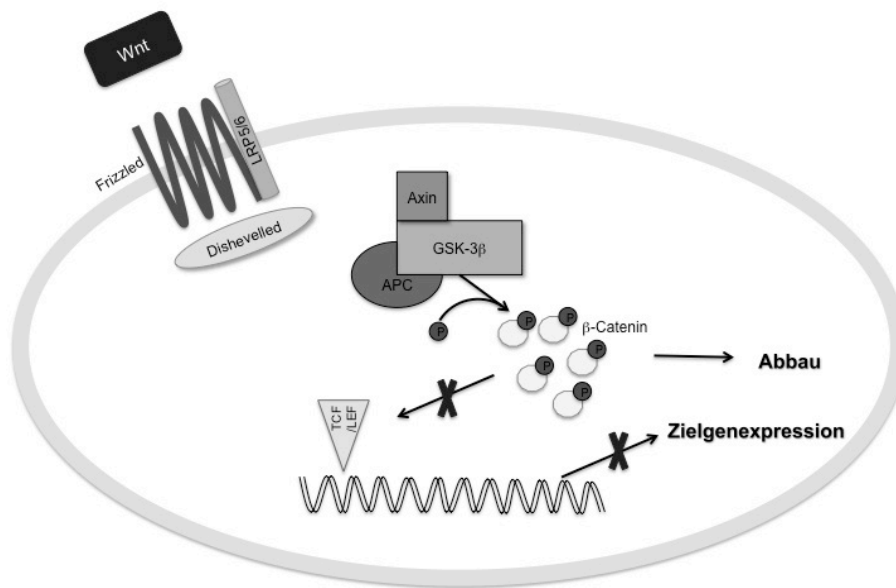
Der Corezeptor LRP 5/6 besteht aus einer extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Domäne. Diese sind für die Signaltransduktion unabdingbar [85].

### 1.3.3 Der kanonische Wnt-Signalweg

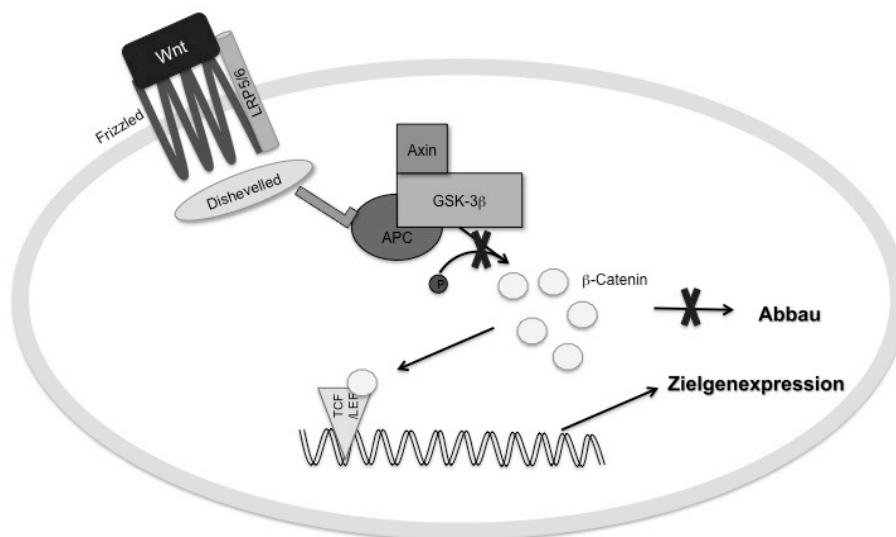
Der entscheidende Moment im kanonischen Wnt-Signalweg ist die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma/Nukleus der Zelle. Ein Destruktionskomplex bestehend aus dem Tumor Supressor Adenomatous Polyposis Coli (APC), Axin, der Serin-Threonin-Kinase Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) und Casein Kinase-1 $\alpha$  (CK-1 $\alpha$ ) [86], hält die Konzentration von  $\beta$ -Catenin unter Abwesenheit von Wnt gering. Dieser Komplex erreicht eine niedrige  $\beta$ -Catenin Konzentration, indem er  $\beta$ -Catenin phosphoryliert. Dies ist für die Proteasomen der Zelle ein Signal  $\beta$ -Catenin zu degradieren [87]. Dieser Vorgang wird in Abbildung 4A dargestellt.

In Anwesenheit von Wnt werden Fz und LRP 5/6 aktiviert. Anschließend wird das Signal über den Rezeptor an *Dishevelled* (Dvl) weitergeleitet. Folglich wird der Destruktionskomplex um GSK-3 $\beta$  inhibiert und somit liegt  $\beta$ -Catenin im nicht phosphorylierten Zustand vor. Durch den nicht stattfindenden Abbau kommt es zur Akkumulation [88] und zur Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus. Durch Binden an Transkriptionsfaktoren der Familie der T-zell spezifischen Transkriptionsfaktoren/Lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) reguliert  $\beta$ -Catenin die Expression der Zielgene [89]. Es entsteht  $\beta$ -Catenin/TCF. Diesen Vorgang stellt Abbildung 4B dar.

A)



B)



**Abbildung 4** zeigt den kanonischen Wnt-Signalweg. **A)** Ohne Bindung eines Wnt-Liganden.  $\beta$ -Catenin liegt im phosphorylierten Zustand vor und wird abgebaut. **B)** Vorliegen einer Bindung eines Wnt-Liganden.  $\beta$ -Catenin liegt nicht phosphoryliert vor und bildet einen Komplex mit TCF/LEF. Somit kommt es zur vermehrten Wnt-Zielgenexpression. Abbildung adaptiert an Schinner et al. [90].

In Säugern sind vier verschiedene TCF bekannt. TCF-7, LEF-1, TCF7L1 (TCF-3) und TCF7L2 (TCF-4). In intestinalen Zellen ist TCF7L2 der Hauptpartner von  $\beta$ -Catenin [91].

In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin bindet TCF an die spezifische Sequenz CTTTG(A/T)(A/T) am Wnt-Zielgen-Promotor und inhibiert dort die Expression. Bei Aktivierung des Wnt-Signalweges, resultiert eine hohe Konzentration von  $\beta$ -Catenin im Nukleus. TCF wird durch Bindung mit  $\beta$ -Catenin in einen Transkriptionsfaktor verwandelt, der an das *G2 enhancer element* bindet. So geht der inhibierende Effekt verloren und die Zielgene werden vermehrt abgelesen durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren [26].

#### 1.3.4 Der Wnt-Signalweg und die intestinalen endokrinen L-Zellen

Aktuell steht der Wnt-Signalweg im besonderen Interesse der Diabetesforschung. Eine *in vitro* Studie von Ni et al. verdeutlicht wie wichtig Wnt-Moleküle für die *Gcg* Expression, also das GLP-1, sind.

Lithium, ein Inhibitor von GSK-3 $\beta$ , führt über die Hemmung der GSK-3 $\beta$  zum intrazellulären Anstieg von  $\beta$ -Catenin und dies zur Stimulation der *Gcg*-Transkription in intestinalen endokrinen Zellen. In weiteren Versuchen führte eine Zugabe von  $\beta$ -Catenin zur Stimulation der Transkription des *Gcg* vermutlich vermittelt durch den Promotor G2 [92]. Zur Bestätigung sind weitere Studien notwendig.

2004 entdeckten Kanazawa et al. eine Verbindung zwischen einem Wnt-Signalmolekül und der Entstehung eines Diabetes mellitus. Dort identifizierte die Gruppe das Wnt-5B-Gen. Dieses legt den Verdacht nahe im Zusammenhang mit der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 zu stehen [93].

Im Jahre 2006 fanden Grant et al. und eine weitere Forschergruppe um Florez ein weiteres Kandidatengen aus dem Wnt-Signalweg, welches in Verbindung mit der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 steht. Sie deckten bestimmte Polymorphismen, sog. SNP's (Single Nucleotide Polymorphism's), im Intron 3 und 4 des für den Transkriptionsfaktor TCF7L2 kodierenden Gens auf. Der gefundene

Polymorphismus besitzt die größte Gen-Disposition zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 [8-10]. Es ist bisher nicht ersichtlich, wie diese SNP's zur Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 führen [11].

Die bisher untersuchten Polymorphismen im TCF7L2-Gen steigern das Risiko für jedes vererbte Allel um 30-50%, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln. Dieses beschriebene Risiko ist doppelt so hoch im Vergleich zu anderen Risikogenen [90]. Einerseits belegten weitere Studien auf Genomebene [94-96] und andererseits mit ethnischen Gruppen die Assoziation des TCF7L2 Polymorphismus mit Diabetes Typ 2 [97-99].

Noch nicht sicher ist, wie die Mutation im TCF7L2-Gen zur Entwicklung eines Diabetes beiträgt. Die Polymorphismen scheinen die Insulinsekretion mehr zu beeinflussen als die Insulinsensitivität. Zudem wird eine Verbindung zum Inkretinsystem vermutet [100].

Eine Annahme, dass die GLP-1 Sekretion in Risikoallelträgern vermindert ist, wurde durch Studien mittels Durchführung von oGTT's in Risikoallelträgern und Nicht-Risikoallelträgern widerlegt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in den GLP-1 Spiegeln von beiden Gruppen [101-103]. Der einzige Unterschied wurde in einer veränderten Insulinsekretion beobachtet [12].

Daher liegt nahe, dass nicht eine veränderte GLP-1 Sekretion, sondern eine Modulation der GLP-1-Wirkung auf die  $\beta$ -Zelle des exokrinen Pankreas durch die Polymorphismen von TCF7L2 möglich ist [90].

Philippe zeigte in zwei Studien, dass Insulin zur Inhibierung der *Gcg* mRNA-Expression in  $\alpha$ -Zellen des Pankreas führt. Diese Inhibition ist physiologisch von hoher Wichtigkeit, denn die *Gcg* mRNA-Expression in  $\alpha$ -Zellen führt zur Produktion vom Gegenspieler des Insulin, dem Glukagon [104, 105].

Yi et al. fanden an Zelllinien heraus, dass Insulin die *Gcg*-Expression in intestinalen L-Zellen stimuliert. Insulin benutzt verschiedene Moleküle des kanonischen Wnt-Signalwegs um die *Gcg* mRNA-Expression zu stimulieren. Eine fehlende Insulin-stimulierte *Gcg* mRNA-Expression stellte sich in Zellen mit fehlender  $\beta$ -Catenin-Produktion oder fehlender Funktion von TCF7L2 heraus [26].

Eine Erklärung dafür, dass Insulin nicht auch die *Gcg*-Expression in den  $\alpha$ -Zellen stimuliert, zeigten Yi et al. bereits drei Jahre zuvor.  $\alpha$ -Zellen exprimieren kein TCF7L2 [91].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass hohe Glukosekonzentrationen die Expression von Wnt-Signalmolekülen in L-Zellen inhibieren. Weiterhin wurde untersucht, ob ausgewählte Glukose senkende Substanzen einen regulierenden Effekt auf die Expression von Wnt Signalmolekülen in endokrinen intestinalen L-Zellen haben.

Diese Hypothese beruht auf folgenden Hintergrund:

GLP-1 ist auf dem *Gcg* in endokrinen intestinalen L-Zellen kodiert. Neben dem oben beschriebenen Inkretin-Effekt führt das Inkretin GLP-1 auch zu einer Proliferation und verringerten Apoptoserate von pankreatischen  $\beta$ -Zellen *in vitro* und in Tiermodellen.

Beim Diabetes mellitus Typ 2 kommt es zu einem progredienten Verlust von pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Die GLP-1 Freisetzung ist beim Diabetes mellitus Typ 2 vermindert. Zudem wird das Inkretinkonzept seit einigen Jahren therapeutisch genutzt, indem entweder GLP-1-Analoga zugeführt werden oder der Abbau von endogenem GLP-1 gehemmt wird. Es ist deshalb von großem pathophysiologischen und therapeutischen Interesse zu verstehen, wie die Expression und Sekretion von endogenem GLP-1 in L-Zellen reguliert wird.

Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass der Wnt-Signalweg ein zentraler Regulator metabolischer Funktionen (u.a. der GLP-1 Sekretion, s.u.) ist.

In dieser Arbeit gehe ich auf den kanonischen Wnt-Signalweg ein, da dieser im metabolischen Kontext eine Rolle spielt. In der Kaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs kommen extrazelluläre Rezeptorliganden (Wnts), membranständige Rezeptoren (Fz), Korezeptoren (LRP 5/6) sowie intrazelluläre Signalkomponenten vor, unter denen  $\beta$ -Catenin und die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie eine besondere Rolle für die Expressionsregulation von Wnt-Zielgenen spielen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Wnt-Signalweg im Bereich der Diabetesforschung zuteil, als herausgefunden wurde, dass bestimmte genetische

Varianten innerhalb des TCF7L2-Gens die bisher stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 zeigen.

Einige Arbeiten der letzten Jahre weisen dem Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der *Gcg* Expression in L-Zellen zu [92]. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass Zugabe exogener Wnt Signalmoleküle oder pharmakologische Aktivierung des Signalweges zu einer vermehrten Bildung von GLP-1 führt. Weiterhin ist bekannt, dass Wnt Signalmoleküle in L-Zellen exprimiert werden; wie diese in ihrer Expression reguliert werden, ist jedoch bisher nicht bekannt und Gegenstand dieser Arbeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Substanz	Lieferant
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aqua destillata	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken-Scheidt
Beta-Catenin (aktive S45A-Mutante)	Wolfson Digestive Diseases Centre, University of Nottingham, UK)
Biotin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
CellLytic™m Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-Pantothenat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Exendin-4	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kälberserum, fetales (FKS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kollagenase (Collagenase NB 8 Broad Range)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Metformin (1,1 Dimethylbiguanid Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)



Nanofectamin	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
PCR-Primer: - Mus musculus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Actin, beta (Actb)</li> <li>• TCF7L2 (TCF4)</li> <li>• Wingless-related MMTV integration site 4 (Wnt4)</li> </ul>	TIB Molbiol (Berlin) Qiagen GmbH (Hilden) Qiagen GmbH (Hilden)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen (Darmstadt)
Plasmide: <ul style="list-style-type: none"> <li>• TOPflash</li> <li>• FOPflash</li> </ul>	Upstate Cell Signaling Solutions (Charlottesville, Virginia, USA) Upstate Cell Signaling Solutions (Charlottesville, Virginia, USA)
pRL-TK-Plasmid	Promega (Mannheim)
Tolbutamid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin (5% Trypsin EDTA)	Invitrogen (Darmstadt)
Wnt3a, rekombinant	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt)

### 2.1.2 Medien

Medium	Lieferant
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose, with Sodium Pyruvate, with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Low Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate	Invitrogen (Darmstadt)
---	------------------------

### 2.1.3 Lösungen, Puffer und Medium

Lösung/Puffer	Zusammensetzung/Lieferant
DPBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline)	Invitrogen (Darmstadt)
Krebs-Ringer-Puffer (KRP) (pH 7,1 – 7,3)	154 mM Natriumchlorid 154 mM Magnesiumsulfat 154 mM Kaliumchlorid 100 mM Natriumdihydrogenphosphat 100 mM Kalziumchlorid

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Filterpapier	Bio-Rad (München)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Foster City, California, USA)
Kryo-Röhrchen	Nunc (wiesbanden)
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems (Foster City, California, USA)
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Foster City, California, USA)
Pasteurpipetten (steril)	Ratiolab GmbH (Dreieich)
PCR Tubes (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)

Pipettenspitzen: - mit Filter: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bevelled Filter Tips (1 – 100 µl)</li> <li>• Extended Length Filter Tips (101 – 1000 µl)</li> <li>• Filter Tips (0,1 – 10 µl)</li> <li>• Natural Filter Tips (10 µl XL)</li> </ul> - ohne Filter: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extended Length, Natural Tips (0,1 – 10 µl)</li> <li>• Natural Bevelled Filter Tips (1 – 200 µl)</li> <li>• Natural Graduated Pipette Tips (101 – 1000 µl)</li> </ul>	Starlab (Ahrensburg)
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 ml, 50ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated Costar (Corning, New York, USA)
UVetten®	Eppendorf (Hamburg)
Zellkulturflaschen mit Filtertop (50 ml, 250 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturplatten <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6-Well-Platte</li> <li>• 24-Well-Platte</li> </ul>	Greiner Bio-One (Frickenhausen) Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturschalen (Ultra-Low-Attachment)	Corning Incorporated Costar (Corning, New York, USA)

## 2.1.5 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
BioPhotometer + DPU414 Thermal Printer	Eppendorf (Hamburg) Seiko Instruments Inc. (Neu-Isenburg)
Brutschrank BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Luminometer (Lumat LB9507)	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
Polystyrol-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
QIASchredder™	Qiagen GmbH (Hilden)
Real-Time PCR-Gerät (StepOne-Plus™ Real-Time PCR-System) Notebook inklusive StepOne™-Software v 2.0.1	Applied Biosystems (Foster City, California, USA) DELL (Round Rock, Texas, USA)
Schüttler (Shaker AGT 50)	Rettberg (Göttingen)
Sicherheitswerkbank (Hera Safe)	Heraeus (Hanau)
Thermocycler	Biometra – Biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer (Type REAX 1)	Heidolph (Kelheim)
Zellschaber (Dispenser)	TPP-Tissue Culture and Laboratory Technology (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biofuge pico</li> <li>• Centrifuge 5810 R</li> <li>• Zentrifuge universal 30 RF</li> </ul>	Heraeus (Hanau) Eppendorf (Hamburg) Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur GLUTag Zellen

In der Zellkultur wurde mit GLUTag Zellen, die von Dr. Daniel J. Drucker (Mount Sinai Hospital, Samuel Lunenfeld Research Institute, University of Toronto, Kanada) bereitgestellt wurden, gearbeitet. Dies ist eine stabile immortalisierte murine enteroendokrine Zelllinie, welche *Gcg* exprimiert und Glucagon-like peptide sezerniert. GLUTag Zellen wurden von einem Glukagon-produzierenden enteroendokrinen Tumor isoliert, der in *Gcg* SV40 T Antigen transgenen Mäusen entstand [106, 107]. GLUTag Zellen werden häufig für die Analyse von GLP-1/GLP-2 sekretionsfördernden Mitteln benutzt. Außerdem für Studien, die sich mit der *Gcg* Transkription befassen [108].

Die Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden allesamt unter der Sterilbank (Hera Safe, Hereus Instruments, Hanau) abgehalten. Die GLUTag Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und bei einer Luftfeuchtigkeit von 90% in einem Brutschrank (BBD 6220, Hereus Instruments, Hanau) in Kultur gehalten.

Zur Kultivierung wurden 50 ml bzw. 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) verwendet. Die kleinen Zellkulturflaschen wurden mit 8 ml und die großen mit 20 ml DMEM High Glucose Medium (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) befüllt. An Zusatzstoffen kamen 10% FKS (Sigma-Aldrich, Steinheim), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Darmstadt) hinzu.

Pro Woche wurden die Zellen zwei Mal passagiert. Hierzu wurde das Medium mit einer Pipette (Stripette, Corning Incorporated Costar, Corning, New York, USA) abgesaugt. Anschließend wurden die jetzt freiliegenden GLUTag Zellen mit 2,5 ml DPBS (Invitrogen, Darmstadt) gewaschen. Nach dem Absaugen des DPBS wurden die Zellen zum Ablösen vom Zellkulturflaschenboden drei Minuten mit 2,5 ml Trypsin (Invitrogen, Darmstadt) versetzt. Um die lösende Wirkung des Trypsins zu blocken, werden die gelösten Zellen mit zusätzlichen 7,5 ml des oben genannten Mediums in ein steriles 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C, 12.000 rpm und 5 min (Zentrifuge universal 30 RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) wurde der Überstand vom Pellet entfernt. Die Zellen wurden je nach Verwendung oder Versuchen im Verhältnis 1:2 bis 1:8 ausgesät.

Für die einzelnen Versuchsreihen wie der Transfektion und der Stimulation wurden die Zellen auf 24-Well- bzw. 6-Well-Platten ausgesät. Um zu gewährleisten, dass das richtige Zellvolumen auf die einzelnen Wells ausgesät wird, wurden die Zellen nach der Passagierung in der Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim) mit Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt und gezählt.

Zur Zellkultur gehört auch die Konservierung der Zellen. Hierzu wurde ein Einfriermedium hergestellt, welches zu 1:5 aus FKS und 4:5 aus DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) bestand. Dieses wurde 1:1 mit  $2 \times 10^6$  Zellen, die im oben beschriebenen Medium gelöst waren, gemischt. Die Zellen wurden für 24h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  konserviert.

Um die konservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, bedarf es einiger Schritte. Die eingefrorenen Zellen werden mit 9 ml DMEM Medium in ein 50 ml Röhrchen überführt und somit vom für die Zellen toxischen DMSO befreit. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei o.g. Bedingungen wurde das überstehende Medium abgesaugt und das Pellet mit 8 ml DMEM Medium inklusive 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin suspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 50 ml Zellkulturflasche überführt und für 24h in den Brutschrank gestellt. Je nach Konfluenz der Zellen wurde ein Mediumwechsel oder eine Passagierung in eine 250 ml Zellkulturflasche durchgeführt.

## 2.2.2 Herstellung von Fat cell-conditioned Medium (FCCM)

Für die Experimente mit FCCM wurden vier verschiedene Fettgewebsproben verarbeitet. Dazu wurde während elektiver viszeral-chirurgischer Eingriffe abdominales Fettgewebe gewonnen. Fettgewebsbeispiele mit einem Gewicht von 6 – 8 g wurden sofort in serumfreien DMEM Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin in das Labor transportiert.

Das Fettgewebe wurde anschließend steril unter der Sterilbank verarbeitet. Die Gewebestücke wurden in eine Zellkulturschale (Corning Incorporated Costar, Corning, New York, USA) mit DPBS gegeben. Dort wurden makroskopisch erkennbares Drüsen- und Bindegewebe, sowie Blutgefäße entfernt. Nach der

Zerkleinerung des Fettgewebes wurde dieses mit warmen DPBS gewaschen und in ein 50 ml Röhrchen gegeben.

Gleichzeitig wird eine Kollagenaselösung (Serva Electrophoresis, Heidelberg) in KRP zubereitet und steril filtriert. 3 ml Kollagenase werden auf 1 g Fettgewebe zum Verdau in das Röhrchen gegeben. Die Röhrchen werden sorgfältig verschlossen und waagrecht im Wasserbad bei 37°C für 45 – 60 min unter leichtem Schütteln (ca. 70 Schläge/min) inkubiert.

Beim Verdau der Stücke wurde die Lösung dreimal durch ein Nylonsieb mit 250 µm Porengröße filtriert und mit KRP gewaschen.

2,5 ml des Aussaatmediums wurden pro Well einer 6-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gegeben und mit 2 ml gepackten Adipozyten überschichtet. Diese Platte wurde unter definierten Bedingungen des Brutschrankes (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 99% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Nach 24h wurde der Unterstand eines jeden Wells abgesaugt, gepoolt, steril filtriert und in 15 ml Röhrchen aliquotiert.

Das Kontrollmedium (CM) wurde hergestellt, indem Aussaatmedium ohne Adipozyten in den Brutschrank über 24h gestellt wurde. Unter den gleichen Bedingungen wie FCCM. Am nächsten Tag wurde auch dieses abgenommen, gepoolt, steril filtriert und in 15 ml Röhrchen aliquotiert.

Für die FCCM-Gewinnung lag das Ethikvotum des Universitätsklinikum Düsseldorf mit der Nummer 2292 vor.

### 2.2.3 Transiente Transfektion von GLUTag Zellen

Für die transiente Transfektion von GLUTag Zellen wurden die zwei Plasmide TOPFlash (TF) und pRL-TK (Promega, Mannheim) benutzt. TOPFlash (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, Virginia, USA) ist ein TCF-Reporter Plasmid. Es dient als Zielgen für den Wnt-Signalweg in der Zielzelle. Neben der TCF-Region befinden sich das Gen für die Leuchtkäfer-Luciferase (*Firefly luciferase*) und der vorgeschaltete Thymidinkinase-Promotor des Herpes-simplex Virus auf dem Plasmid. Dieser Thymidinkinase Promotor führt zu einer niedrigen basalen Expression der Luciferase. Des Weiteren liegen vor dem Promotor drei

Bindungsstellen für TCF-Transkriptionsfaktoren. Bei einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Zelle wird durch diese TCF Bindungsstellen die Expression der Luciferase gesteigert. Somit dient das TOPFlash-Plasmid als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde das FOPFlash-Plasmid (FF) benutzt. FOPFlash besitzt eine mutierte TCF-Region. TCF-Transkriptionsfaktoren können somit nicht binden und der kanonische Wnt-Signalweg kann nicht aktiviert werden.

Die Leuchtkäfer-Luciferase (Promega, Mannheim) kodiert auf dem Plasmid für ein Protein, welches durch eine Oxidationsreaktion eine Biolumineszenz hervorruft.

Das andere Plasmid, pRL-TK, besitzt eine andere Art der Luciferase. Diese wird als Seefeder-Luciferase (Renilla Luciferase) bezeichnet. Sie besitzt ebenso einen vorgeschalteten Thymidinkinase-Promotor, der gleichermaßen wie der Promotor des TF für eine niedrige basale Expression der Luciferase sorgt.

Die emittierten Lumineszenzen können mit einem Luminometer gemessen werden. Je mehr emittiertes Licht gemessen wird, umso mehr Luciferase wurde exprimiert und gebildet. Die beiden unterschiedlichen Luciferasen werden bei unterschiedlichen Wellenlängen des Lichts aktiviert. Die vom TF bei 562 nm und die des pRL-TK bei 482 nm. Letztlich werden die beiden Aktivitäten relativ zueinander ins Verhältnis gesetzt. Da die Luciferase des pRL-TK konstitutiv gebildet wird, ist sie ein relatives Maß für die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen. Damit wird dieses Maß für die Transfektionseffizienz herangezogen. Die Menge und Aktivierung der TF Luciferase ist von vorhandenen Aktivatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs abhängig. Somit ist dieser Wert ein relatives Maß für die Aktivierung durch  $\beta$ -Catenin. In jeder Probe wird das emittierte Licht der TF Luciferase auf die emittierte Menge der pRL-TK Lichtmenge bezogen.

Für die Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well auf einer 24-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Diese Platte wurde für 24h in den Brutschrank gestellt und anschließend mit den oben beschriebenen Plasmiden versehen. Pro Well wurden 0,25  $\mu\text{g}$  TF und 0,1  $\mu\text{g}$  pRL-TK transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Nanofecatamin (PAA, Laboratories GmbH, Cölbe) verwendet. Mit seiner polykationischen Oberflächenstruktur zeigt es sich in der Lage mehrere Nukleinsäuren zu binden und mit ihnen Lipoproteinkomplexe zu bilden. Diese sogenannten Transfektionskomplexe fusionieren mit der Zellmembran und entlassen daraufhin die Nukleinsäuren in das Zellinnere.



Die Plasmide wurden in serumfreien Medium und Nanofectamin in DPBS (Invitrogen, Darmstadt) gelöst. Diese beiden Lösungen wurden anschließend zusammengeführt und bei Raumtemperatur inkubiert, um zu gewährleisten, dass sich die Transfektionskomplexe bilden bevor sie auf die Zellen pipettiert wurden.

Nach 30 min wurden auf jedes Well 100  $\mu$ l der Transfektionslösung pipettiert. Die Transfektion fand über 24h im Brutschrank statt.

Zur Auswertung der Transfektion wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Mannheim) hinzugezogen. Das Medium der GLUTag Zellen in den Wells wurde abgenommen. Anschließend wurde auf die Zellen für 7 min 100  $\mu$ l eines passiven Lysepuffers (Passive Lysis Buffer, Promega, Mannheim) gegeben. Das nach Abschluss der 7 min resuspendierte homogene Zelllysats wurde auf Eis gestellt. 5  $\mu$ l jedes einzelnen Zelllysats wurden mit 25  $\mu$ l des ersten Substrats, Luciferase Assay Reagent (LAR; Promega, Mannheim), in ein Polystyrol-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg) gegeben und resuspendiert.

Die erste photometrische Messung wurde mit einem Luminometer (Lumat, LB 9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad) vorgenommen. Anschließend wurden dem Gemisch 25  $\mu$ l des zweiten Substrats, der Stop & Glow Reagenzlösung (Promega, Mannheim), hinzugefügt. Sinn dieses Substrats ist es zu einer starken Abnahme der Firefly-Luciferase-Aktivität zu führen. Stop & Glow enthält gleichzeitig die Renilla-Luciferase, deren Aktivität bei der zweiten photometrischen Messung ermittelt wurde. Um zu berechnen wie hoch die TF-Aktivität, also die Aktivität des Wnt-Signalwegs, war, wurde der Quotient für jede Probe aus dem photometrischen Wert der Firefly- und der Renilla-Luciferase gebildet. Daraufhin wurden die drei Quotienten der gleichbehandelten Proben gemittelt. Die errechneten Mittelwerte wurden zu den Mittelwerten der Kontrolle in Relation gesetzt und in Prozent angegeben.

### **Kotransfektion mit einem konstitutiv aktiven $\beta$ -Catenin Mutanten**

Ein Plasmid, das  $\beta$ -Catenin (konstitutive aktive S45A-Mutante, T. Hagen, Wolfson Digestive Diseases Centre, University of Nottingham, UK [109]) wurde nach dem ersten Tag der transienten Transfektion auf die einzelnen Proben in unterschiedlichen Konzentrationen (0,25  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g und 0,05  $\mu$ g) pipettiert.  $\beta$ -Catenin wurde mit dem jeweiligen Plasmiden auf die Zellen pipettiert. Zur Kontrolle wurden jeweils drei Wells mit derselben  $\beta$ -Catenin-Plasmid-Konzentration behandelt.

### **Stimulation mit rekombinanten Wnt3a**

GLUTag Zellen wurden mit rekombinanten Wnt3a (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nodenstadt) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (100 ng/ml und 10 ng/ml) stimuliert. Wnt3a wurde in serumfreiem Medium gelöst und einen Tag nach der Transfektion auf jeweils drei Wells pipettiert. Dieses inkubierte für 24h. Anschließend wurde auf die transfizierten Zellen wie oben beschrieben die Luciferase pipettiert. So konnte mittels photometrischer Messung die Aktivität des Wnt-Signalwegs bestimmt werden.

### **Stimulation mit Fat cell-conditioned Medium (FCCM)**

In einem Teil der Experimente wurden GLUTag Zellen zusätzlich mit 750 µl FCCM stimuliert. FCCM wurde einen Tag nach der Transfektion auf drei Wells pipettiert. Dieses inkubierte für 24h. Anschließend wurde auf die transfizierten Zellen wie oben beschrieben die Luciferase pipettiert. So konnte mittels photometrischer Messung die Aktivität des Wnt-Signalwegs bestimmt werden. Als Kontrolle des FCCM diente das eigens für das FCCM hergestellte Kontrollmedium (CM).

#### 2.2.4 Stimulation von GLUTag Zellen

Für die Stimulation wurden pro Well  $1 \times 10^6$  Zellen auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach Inspektion unter dem Mikroskop, ob die Zellen adhärent und konfluent sind, wurde am nächsten Tag das Medium abgesaugt und mit 2 ml DMEM inklusive des Stimulanz aufgefüllt.

Die Stimulantien wurden für die Versuche frisch aus hergestellten Stocklösungen bereitgestellt. Die tatsächliche Stimulation der GLUTag Zellen erfolgte über 24h im Brutschrank.

Im Anschluss an die Stimulation fand die weitere Verarbeitung im Sinne einer RNA-Isolation, Umschreiben in cDNA und Auswerten mittels einer PCR (Polymerase Chain Reaction) statt.

#### 2.2.4.1 Stimulation mit Glukose

GLUTag Zellen wurden mit 2 ml DMEM Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen stimuliert. An verschiedenen Glukosekonzentrationen wurden 5,5 mM (99 mg/dl), 11mM (198 mg/dl), 16,7 mM (300 mg/dl) und 25 mM (450 mg/dl) benutzt. Als Kontrolle zur Ermittlung der Expression der Wnt-Signalmoleküle wurde die Konzentration von 5,5 mM verwendet.

#### 2.2.4.2 Stimulation mit oralen Glukose senkenden Substanzen

GLUTag Zellen wurden mit den verschiedenen Glukose senkenden Substanzen (Exendin-4, Insulin, Metformin, Rosiglitazon und Tolbutamid) stimuliert. Für die einzelnen Substanzen waren aufgrund des Lösungsmittels verschiedene Kontrollen vorhanden. Insulin wurde in HEPES gelöst Tolbutamid in DMSO und die anderen in sterilem Wasser bzw. in DMEM. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen der Glukose senkenden Substanzen.

Antidiabetikum	Konzentration in mol
Exendin-4	10 nM, 20 nM
Insulin	10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M
Metformin	0,5 mM, 1 mM
Rosiglitazon	10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M
Tolbutamid	250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M

**Tabelle 1:** Eingesetzte Konzentration von verschiedenen Antidiabetika. Die Konzentrationen für die Antidiabetika wurden anderen *in vitro* Studien entnommen. Exendin-4 [110-112], Insulin [113, 114], Metformin [115], Rosiglitazon [116], Tolbutamid [117].

## 2.2.5 RNA-Extraktion aus GLUTag Zellen

Die Extrahierung der RNA aus GLUTag Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy® Plus Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden).

Nach Stimulation der Zellen wurde von jedem einzelnen Well das Medium abgesaugt. Anschließend wurden 350 µl des RLT-Puffers, dem zuvor im Verhältnis 1:100 β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugefügt wurde, auf jedes einzelne Well gegeben. Jetzt wurden mit einem Zellschaber (Dispenser, TPP-Tissue Culture and Laboratory Technology, Trasadingen, Schweiz) die adhärenen Zellen vom Wellboden gelöst. Diese Zellsuspension wurde auf den QIAshredder (Qiagen GmbH, Hilden) pipettiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus, Hanau) für zwei Minuten bei 13.000 rpm.

Um das Lysat von überflüssiger genomischer DNA zu befreien, wurde das Lysat auf eine gDNA Eliminatorsäule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben. Die Eliminatorsäulen wurden 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Auf das in Sammelrohren aufgefangene Eluat wurden 350 µl -20°C kaltes 70%-iges Ethanol tröpfchenweise pipettiert. Diese 700 µl Lösung wurde resuspendiert und auf eine spezielle RNeasy® Mini Säule übertragen. Das 700 µl große Volumen wurde mit dieser Säule erneut 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die sich nach der Zentrifugation an der Säule befindliche RNA wurde in drei Waschschrinen gereinigt. Das abzentrifugierte Lysat wurde verworfen.

Zuerst wurden 700 µl des RW1-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) auf die Säule gegeben und 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dann wurden zweimal hintereinander 500 µl des RPE-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) auf die Säule pipettiert und jeweils 15 sec bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die Säule ohne Hinzugabe eines weiteren Puffers für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule mit der darauf gewaschenen RNA wurde jetzt, zum Lösen und Auffangen der RNA, in ein neues Sammelröhrchen überführt. Dafür wurden 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und dieses wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurde die RNA von der Säule gelöst und im Sammelröhrchen aufgefangen. Zur Erhöhung der RNA-Konzentration in dem Sammelröhrchen wurde der letzte Schritt ein zweites Mal durchgeführt.

Die Säulen wurden daraufhin verworfen. Der nächste Schritt bestand in der Messung der Konzentration der in dem Sammelröhrchen eliminierten RNA.

#### 2.2.5.1 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Von den Proben der RNA-Extraktion wurden jeweils 5 µl in einer UVette® (Eppendorf, Hamburg) in einem Verhältnis von 1:20 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) wurde in dieser UVette® die Konzentration der isolierten RNA mithilfe der Messung optischen Dichte bestimmt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz errechnet.

Zum Vermeiden von Verunreinigungen durch Proteine, wurde darauf Wert gelegt, dass das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zur optischen Dichte bei 280 nm zwischen 1,8 und 2 lag.

#### 2.2.6 cDNA Reverse Transkription

Zur Überführung der RNA von GLUTag Zellen in einzelsträngige cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) benutzt.

Dazu wurden maximal 2 µg RNA von jeder zuvor gewonnenen Probe bereitgestellt. Je nach Ausbeute bei der RNA-Extraktion wurde das benötigte Volumen von RNA ausgerechnet und mit sterilen Pipetten in kleine Reaktionsgefäße (PCR-Tubes, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) gefüllt. Je nach Volumen wurde dieses auf 10 µl mit Nuklease freiem Wasser komplettiert.

Diesem 10 µl großem RNA-Volumen wurden 10 µl eines zuvor produzierten Reaktionsgemisches hinzugefügt. Dieses bestand aus den in Tabelle 2 ersichtlichen Bestandteilen.

Komponente	Volumen/Reaktion in $\mu\text{l}$
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Nuklease freies Wasser	4,2
Gesamtvolumen	10,0

**Tabelle 2:** Bestandteile des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Master Mix.

Dieses neu hergestellte Gemisch wurde vorsichtig resuspendiert und anschließend kurz abzentrifugiert, sodass sich die gesamte vorhandene RNA im Gemisch befand. Damit die Reaktionen für die Umschreibung in cDNA ohne Probleme ablaufen konnten, war die Überführung der Tubes in einen Thermocycler mit in Tabelle 3 folgendem Programm (Biometra-Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) nötig.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	25	37	85	4
Zeit in min	10	120	5	$\infty$

**Tabelle 3:** Schritte der reversen cDNA Transkription.

### 2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation von DNA. Diese Methode beruht auf einen immer wiederkehrenden Zyklus. Dieser besteht aus drei Schritten:

Im ersten Schritt wird die zu vervielfältigende DNA denaturiert (Denaturierung), indem der Doppelstrang der DNA an den Wasserstoffbrückenbindungen

aufgespalten wird. Die Primer können sich anschließend an den freien Stücken anlagern (Primer-Annealing). Diese dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerasen, welche die DNA kopieren (Elongation). Hierdurch kommt es zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.

Bei der hier angewandten PCR-Methode handelt es sich um eine quantitative Real-Time PCR. Mit der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs. Diese Methode wird verwendet, um die Gen-Expression bestimmter Gene zu analysieren. Außerdem ermöglicht diese Methode die Amplifikation und die Detektion der DNA-Abschnitte in einem Schritt [118, 119].

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Qiagen GmbH, Hilden) wurde in dieser Arbeit verwendet. Dieser Farbstoff kann in der Elongationsphase an doppelsträngige DNA binden und detektiert somit PCR-Produkte während ihrer Akkumulation in den einzelnen Zyklen. Das hier verwendete PCR-Gerät (Step One Plus Systems, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) detektiert das emittierte Licht des gebundenen SYBR® Green Farbstoffes und ändert es in ein elektrisches Signal um. Dieses Vorgehen findet jeweils am Ende der Elongationsphase jedes einzelnen Zyklus statt. Nach dieser Phase ist die DNA-Menge amplifiziert und die Fluoreszenz fällt stärker aus.

Der nächste Zyklus beginnt wieder mit der Denaturierung und der SYBR® Farbstoff löst sich von den Strängen, um sich anschließend an die vermehrt gebildeten Doppelstränge zu binden.

Aus den von dem PCR-Gerät gemessenen Emissionen werden Amplifikationskurven gebildet. Mit diesen wird der  $C_T$ -Wert (Cycle-Threshold) für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau ausgerechnet. Der  $C_T$ -Wert beschreibt eine theoretische Größe, die den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve darstellt. In anderen Worten besagt dieser Wert, wie viel Zyklen einer PCR notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, also einen Schwellenwert (Threshold). Die Größe spielt vor allem eine Rolle bei der Quantifizierung von DNA-Molekülen.

Die Genexpression wurde mit der  $\Delta\Delta$ - $C_T$ -Methode ausgerechnet. Diese Methode erlaubt eine relative Quantifizierung von Genen. Es wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines konstant exprimierten Referenzgens (*housekeeping gene*) bezogen. Die Definition des Referenzgens lautet, dass diese

Gene unbeeinflusst von Versuchsbedingungen reguliert, überall und homogen exprimiert werden.

Je früher der Zyklus, bei dem das konstant definierte Fluoreszenzniveau erreicht wurde, desto mehr Kopien einer spezifischen DNA haben zu Beginn des Versuches vorgelegen.

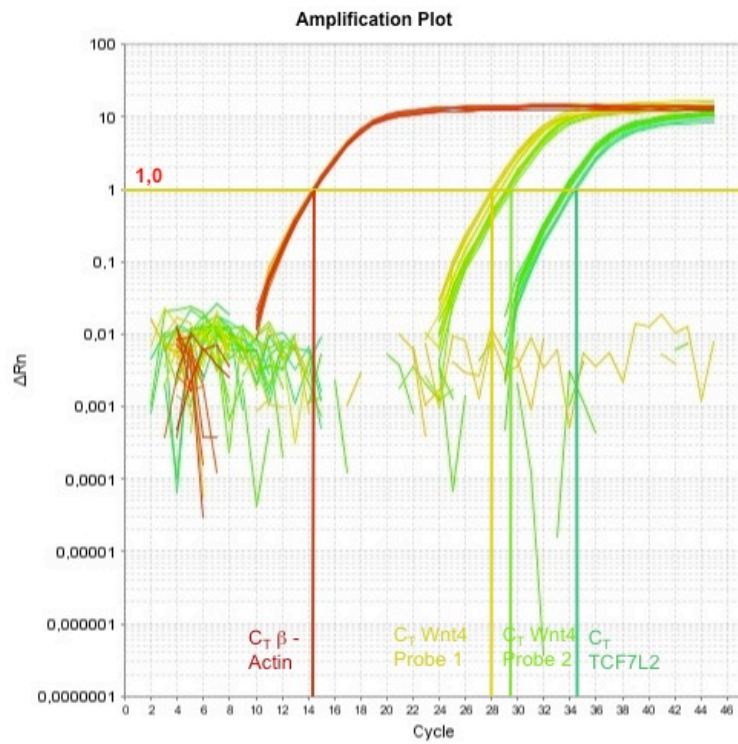
Um den  $\Delta$ - $C_T$ -Wert der Probe zu errechnen, wird der  $C_T$ -Wert des *housekeeping genes* vom  $C_T$ -Wert des Zielgens subtrahiert. Der  $\Delta\Delta$ - $C_T$ -Wert wird durch Subtraktion des  $\Delta$ - $C_T$ -Wertes der Kontrollprobe mit dem  $\Delta$ - $C_T$ -Wert der behandelten Probe errechnet. Die Berechnung des relativen Unterschiedes der Kontrolle und der behandelten Probe ergibt sich aus folgender Formel:

$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$
$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - C_T \text{ Kontrolle}$
$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$

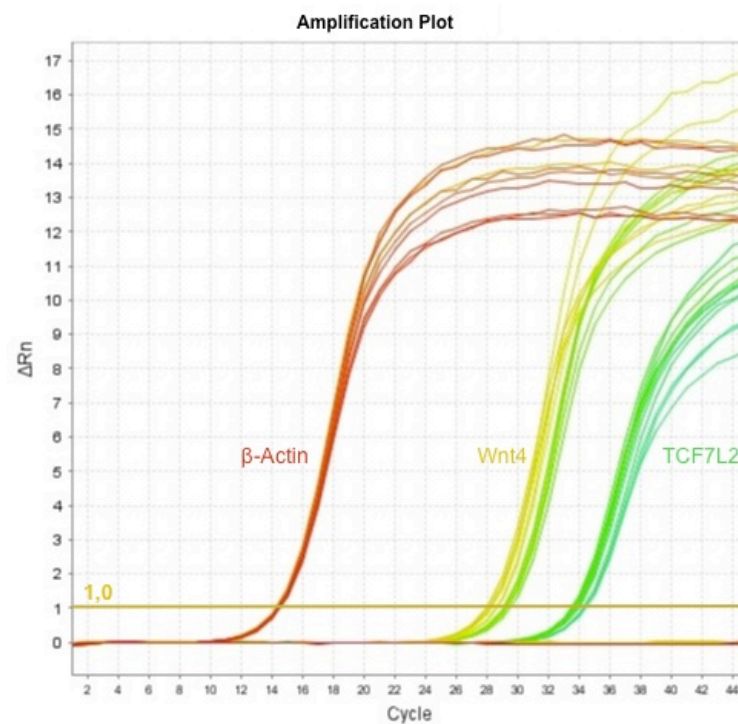
Es wird davon ausgegangen, dass sich die DNA Menge bei jedem Zyklus der PCR verdoppelt. Dafür muss der Threshold der Fluoreszenz so gewählt werden, dass er im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve der PCR liegt (siehe Abbildung 5).



A)



B)



**Abbildung 5:** Darstellung von Amplifikationskurven einer quantitativen Real Time PCR. Als Beispiel sind die Amplifikationskurven von  $\beta$ -Actin (rot), Wnt4 (hellgrün/gelb) und TCF7L2 (türkis-grün)

dargestellt. Die Kurven liegen in halblogarithmischer **A)** und in linearer **B)** Form vor. Die normierte Fluoreszenz ( $\Delta R_n$ ) ist auf der y-Achse dargestellt. Die Anzahl von PCR-Zyklen ist auf der x-Achse zu erkennen. Der Schwellenwert ist in der halblogarithmischen und in der linearen Darstellung bei  $\Delta R_n = 1$  (die beige horizontale Linie). Dieser liegt in der halblogarithmischen Form im linearen Abschnitt der Kurvenverläufe. In der linearen Darstellung entspricht die Linie dem exponentiellen Abschnitt der Amplifikationskurven. Der Schwellenwert von Wnt4 in Probe 1 wurde früher überschritten als in Probe 2 bei vergleichbaren  $C_T$ -Werten für  $\beta$ -Actin. In Probe 1 haben somit mehrere Startkopien vorgelegen.

Die PCR wurde mithilfe des QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook's (Qiagen, August 2009, Hilden) durchgeführt.

Bei dieser Methode wurde der 2x QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix verwendet. Dieser besteht aus Bestandteilen wie HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, SYBR Green I und dem ROX, einen passiven Referenzfarbstoff.

Die HotStarTaq DNA Polymerase wurde von Qiagen modifiziert und liegt bei Raumtemperatur im inaktiven enzymatischen Zustand vor. Diese Tatsache führt zu einer hohen Spezifität der PCR, da vor der ersten Denaturierung keine Produkte gebildet werden können. Das Enzym wird erst bei einer Temperatur von 95°C aktiviert.

Der QuantiTect® SYBR Green PCR Buffer ist ein speziell hergestellter Puffer für die SYBR® Green basierte PCR. Er beinhaltet KCl und  $(NH_4)_2SO_4$ , welche während des Annealings für eine hohe spezifische Primerbindung sorgen. Auch dieser Inhaltsstoff führt zu einer höheren Spezifität der PCR.

SYBR® Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an doppelsträngige DNA anlagert und bei dieser Bindung Fluoreszenz emittiert. Die Erregungs- und Emissionsmaxima liegen bei einer Wellenlänge von 494 nm und 521 nm.

ROX ist ein passiver Referenzfarbstoff. Die Fluoreszenzen dieses Farbstoffes sind während der PCR konstant und ändern sich nicht. Somit werden die anderen Fluoreszenzen auf diesen ROX Farbstoff normalisiert. Dieser Referenzfarbstoff sorgt dafür, dass Fluoreszenzunterschiede durch Pipettierfehler der einzelnen Wells ausgeglichen werden.

Für die PCR wurden QuantiTect® Primer Assay benutzt (Qiagen, Hilden), die für den Gebrauch mit Qiagen Kits mit SYBR® Green basierter Real-time PCR bestimmt sind.

Die hier benutzten Primer binden an Exonregionen der Gene um die Bildung von Koamplifikationen von genomischer DNA zu vermeiden. Diese würde zu einer herabgesetzten Spezifität der PCR führen.

Um eine weitere Fehlerquelle zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Amplifikationsprodukte alle eine ähnliche Länge aufweisen. Somit kann jedes PCR-Produkt ähnlich viel SYBR Green binden. Bei längeren PCR-Produkten würde gleichzeitig mehr SYBR Green gebunden werden und das Fluoreszenzsignal würde falsch zu hoch ausfallen.

Für diese PCR wurden folgende Primer benutzt:

Name	Abkürzung	Spezies	Länge des Tanskripts	Amplikonlänge
transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	TCF7L2	Mus musculus	793 bp	144 bp
wingless-related MMTV integration site 4	Wnt4	Mus musculus	1213 bp	93 bp

**Tabelle 4:** Eigenschaften der benutzten Primer TCF7L2 und Wnt4.

Name	Abkürzung	Spezies	Primersequenz
Actin, beta forward	ACTB 1	Mus musculus	5' - gATCAAgATCATTgCTCCTCCTgAgCg
Actin, beta reverse	ACTB 1	Mus musculus	5' - CgCAgCTCAgTAACAgTCCgCC

**Tabelle 5:** Eigenschaften des benutzten *housekeeping genes* Actb-1.

Für jeden Primer wurde ein Reaktionsgemisch vorbereitet, welches auf Eis gelegt wurde. Das Reaktionsgemisch beinhaltete 12,5 µl von 2x QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix, 2,5 µl 10x QuantiTect® Primer Assay und 7,5 µl RNase freies Wasser. Dies entsprach einem Volumen von 22,5 µl, welches pro Well auf einer 96-Well-Platte (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) aufgetragen wurde. Anschließend wurden 2,5 µl pro Well der Proben cDNA zu den 22,5 µl pipettiert, sodass in jedem Well ein Endvolumen von 25 µl zu finden war. Diese 2,5 µl der Proben cDNA beinhalteten jeweils 100 ng cDNA. Die spätere Messung der Amplifikation wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt um Fehler zu vermeiden.

Die 96-Well-Platte wurde nach Abschluss des Pipettierens mit einer Folie abgeklebt (MicroAmp® Optical Adhesive Film Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA). Daraufhin wurde die Platte eine Minute bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg).

Nach der Zentrifugation wurde die Platte in den Real-Time Cycler eingesetzt (Step One Puls Systems, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) und anlehnend an das Handbuch (QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook, Qiagen, Hilden) folgend eingestellt:

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Zusätzliche Info's
Initialer Aktivierungsschritt für die PCR	15 min	95	Dieser Schritt aktiviert die HotStarTaq DNA Polymerase
45 Zyklen:			
• Denaturierung	15 sec	94	
• Annealing	30 sec	55	
• Elongation	30 sec	72	
			Führt die Fluoreszenzmessung durch

**Tabelle 6:** Einzelne Schritte der quantitativen Real Time PCR.

Nach Beenden der 45 Zyklen wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei dieser wird die DNA durch langsame kontinuierliche Erhöhung der Temperatur auf 95°C gebracht. Hierbei wird bei einer für das Fragment spezifischen Temperatur der Doppelstrang der DNA in einen Einzelstrang aufgespalten. Hierdurch kann der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green nicht mehr binden und diese Änderung des Signals wird registriert. Die Fluoreszenz wird gegen die Temperatur aufgetragen. Das PCR-System berechnet die erste negative Ableitung. Somit kommt ein Diagramm zustande, bei dem ein charakteristischer Peak entsteht. Dieser steht für die spezielle Schmelztemperatur eines Amplikons.

Die Schmelzkurvenanalyse läuft folgend ab:

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

**Tabelle 7:** Schritte der Schmelzkurvenanalyse.

## 2.2.8 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse liegen als Mittelwerte und deren Standardabweichung vor. Die statistischen Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Als signifikant wurden die Ergebnisse betrachtet, wenn der p-Wert < 0,05 war. Ausgewertet wurde alles mit dem Computerprogramm ABI Prism 6.0 (Graph Pad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aktivierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalweges in GLUTag Zellen

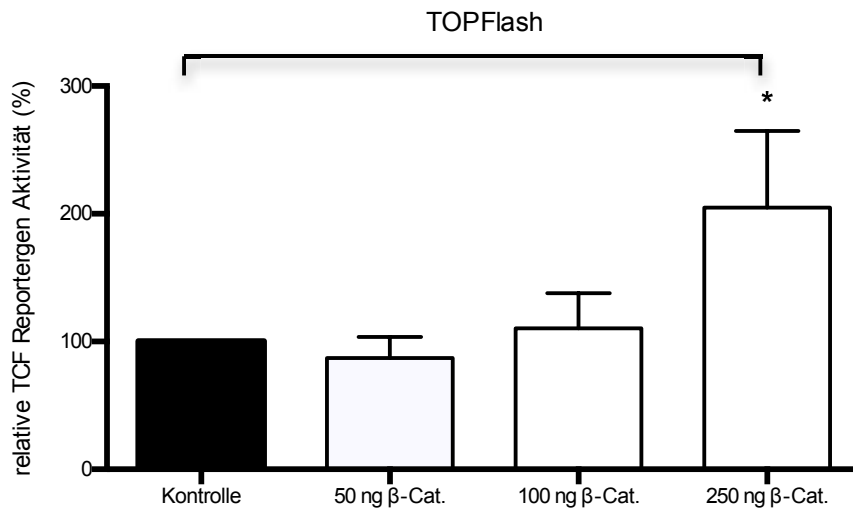
Zur Untersuchung der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in murinen GLUTag Zellen wurden diese mit den zuvor beschriebenen TOPFlash- und pRL-TK-Plasmiden transfiziert.

In einer ersten Experimentenreihe wurde versucht, die Stimulierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalweges durch eine Kotransfektion einer konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin-Mutante hervorzurufen. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen  $\beta$ -Catenin Konzentrationen (250 ng, 100 ng, 50 ng pro well) kotransfiziert. Im Anschluss an die daran stattgefundene Lyse wurden die durch Firefly- und die Renilla-Luciferase hervorgerufenen Biolumineszenzen gemessen, die während der Transfektion entstanden sind.

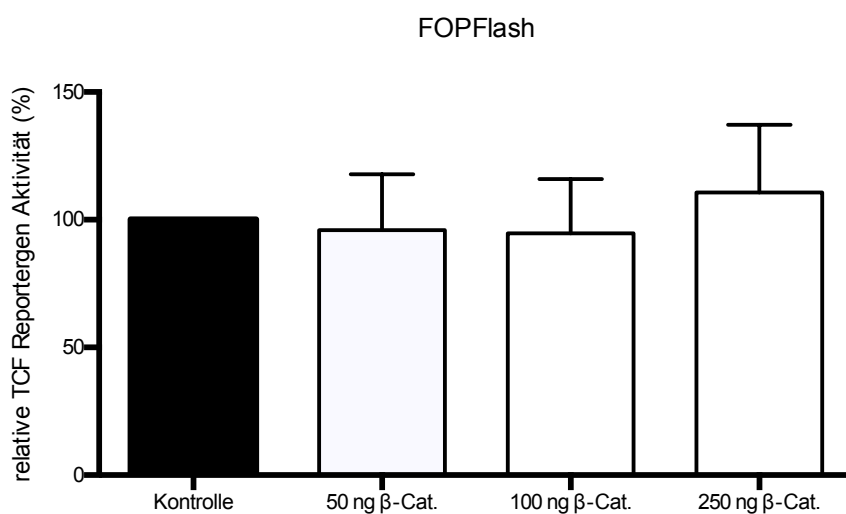
Somit konnte eine Aussage darüber getroffen werden in welchem Maße die verschiedenen  $\beta$ -Catenin Konzentrationen den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren. Zudem konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass die Aktivierbarkeit des Wnt-Signalwegs in unseren experimentellen System funktioniert.

Die Kotransfektion mit der aktiven S45A-Mutante des  $\beta$ -Catenins steigerte dosisabhängig die Transkription des TCF Reporter Gens TOPFlash. 250 ng  $\beta$ -Catenin führten zu einer signifikanten Steigerung der relativen TCF-Reporter-Gen Aktivität von  $204,6 \pm 60,5\%$  ( $p \leq 0.0001$ ) im Vergleich zur Kontrolle ohne jegliche  $\beta$ -Catenin Kotransfektion. Eine Dosis von 100 ng führte zu einer leichten Steigerung von  $110,6 \pm 28\%$ . Diese war nicht signifikant genauso wie die Dosis von 50 ng. Dort gab es keine Steigerung der relativen TCF Reporter-Gen-Aktivität auf  $87,5 \pm 16,3\%$  ab (Abb. 6). Die angewandte Kontrolle wurde nicht mit  $\beta$ -Catenin kotransfiziert.

Als Kontrolle für die spezifische Wirkung von TOPFlash wurde FOPFlash (FF) benutzt. Eine Mutation des TF-Plasmids im Bereich der TCF-Region (s.o.) besteht im FOPflash Konstrukt. In dieser Probe führte erwartungsgemäß die Kotransfektion von  $\beta$ -Catenin nicht zur Aktivierung des Reportergens (Abb. 7). Es stellt somit die Negativkontrolle dar.



**Abbildung 6:** Relative TCF-Reporteraktivität in GLUTag Zellen unter Kotransfektion verschiedener Dosen mit der S45A-Mutanten des  $\beta$ -Catenin (50 ng, 100 ng, 250 ng). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%)  $\pm$  SD von drei voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung. Statistisch signifikant \*  $p \leq 0,05$ .



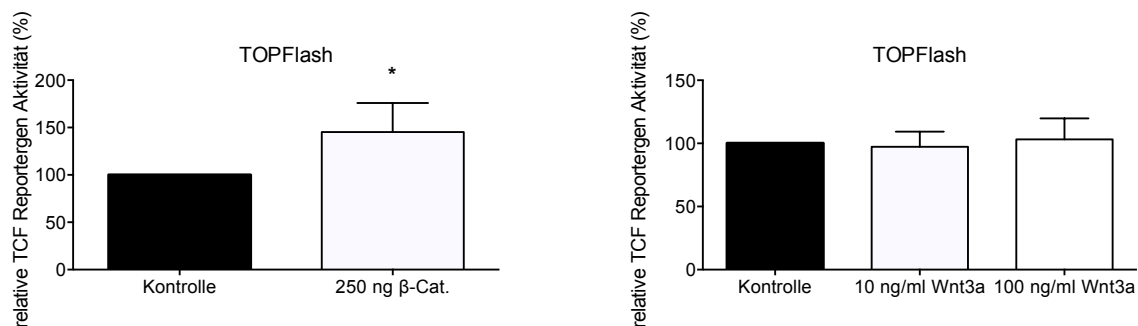
**Abbildung 7:** Relative Reporteraktivität (mutierte TCF-Bindungsstelle) in GLUTag Zellen unter Kotransfektion verschiedener Dosen mit der S45A-Mutanten des  $\beta$ -Catenin (50 ng, 100 ng, 250 ng). Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (%)  $\pm$  SD von drei voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung.

### 3.2 Wirkung von rekombinantem Wnt3a auf ein TCF-Reporterigen in GLUTag-Zellen

In einem weiteren Experiment wurden die mit TOPFlash- und pRL-TK-Plasmid transfizierten Zellen mit Wnt3a, einem bekannten Wnt-Signalaktivator in  $\beta$ -Zellen, über 24 Stunden stimuliert.

Eine Stimulation mit Wnt3a in den Konzentrationen von 100 ng/ml und 10 ng/ml brachte keine signifikante Änderung der relativen TCF-Reporterigen-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Um zu demonstrieren, dass der kanonische Wnt-Signalweg der in diesem Versuch benutzten Passage der GLUTag Zellen funktioniert, wurde eine Probe der Zellen mit 250 ng  $\beta$ -Catenin kotransfiziert. Hier zeigte sich ein positives Ergebnis. Der kanonische Wnt-Signalweg ließ sich mit einem Wert von  $146 \pm 30\%$  ( $p \leq 0.001$ ) aktivieren (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Relative TCF-Reporterigenaktivität in GLUTag Zellen unter Stimulation mit Wnt3a in verschiedenen Dosen (10 ng/ml und 100 ng/ml). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von drei voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung. Statistisch signifikant \*  $p \leq 0,05$ . In diesem Fall führt zusätzlich eine Konzentration von 250 ng S45A-Mutante von  $\beta$ -Catenin zu einer signifikanten Steigerung der Aktivierung des TCF-Reportergens (zur Kontrolle der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in diesen GLUTag Zellen).

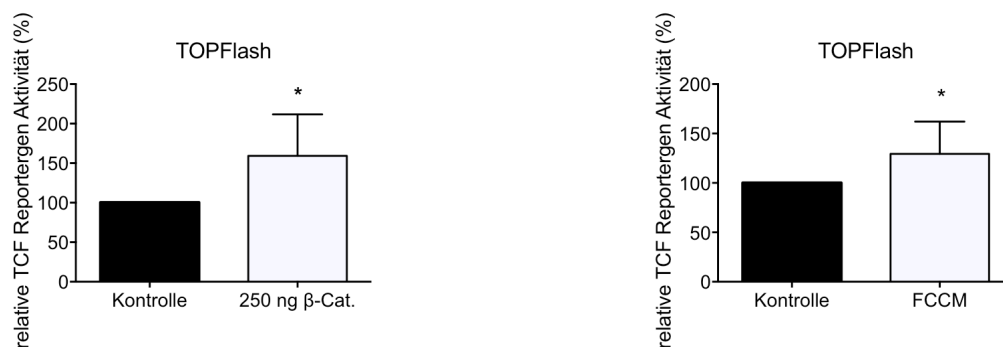


### 3.3 Stimulierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalwegs durch FCCM

In einem dritten Experiment wurden die mit TOPFlash- und pRL-TK-Plasmid transfizierten Zellen mit Fat cell-conditioned medium (FCCM) über 24 Stunden stimuliert.

Eine Stimulation der GLUTag Zellen mit FCCM führte zu einer signifikanten Steigerung der relativen TCF-Reporter-Gen-Aktivität im Vergleich zum Kontroll-Medium auf  $122 \pm 25 \%$  ( $p < 0.01$ ). Somit zu einer Aktivitätssteigerung des kanonischen Wnt-Signalwegs.

Außerdem wurde die in diesem Versuch verwendete Passage der GLUTag Zellen daraufhin untersucht, ob der kanonische Wnt-Signalweg in diesen funktioniert. So wurde eine unstimulierte Probe mit 250 ng  $\beta$ -Catenin kotransfiziert (Positivkontrolle). Hier zeigte sich ein Anstieg der relativen TCF-Reporter-Gen Aktivität auf  $171,4 \pm 74,3\%$  ( $p < 0.01$ ). Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9:** Relative TCF-Reporter-Genaktivität in GLUTag Zellen unter Stimulation mit FCCM und Kontrollmedium. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von vier voneinander unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikant \*  $p \leq 0,05$ . In diesem Fall führt eine Konzentration von 250 ng S45A-Mutante von  $\beta$ -Catenin zu einer signifikanten Steigerung der Aktivierung des TCF-Reporter-Gen (zur Kontrolle der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in diesen GLUTag Zellen). FCCM führt ebenso zu einer signifikanten Steigerung der TCF Reporter-Gen Aktivität (s.o.).

### **3.4 Regulation der mRNA-Expression von Wnt-Signalmolekülen durch unterschiedliche Konzentrationen von verschiedenen Glukose senkenden Substanzen in GLUTag-Zellen**

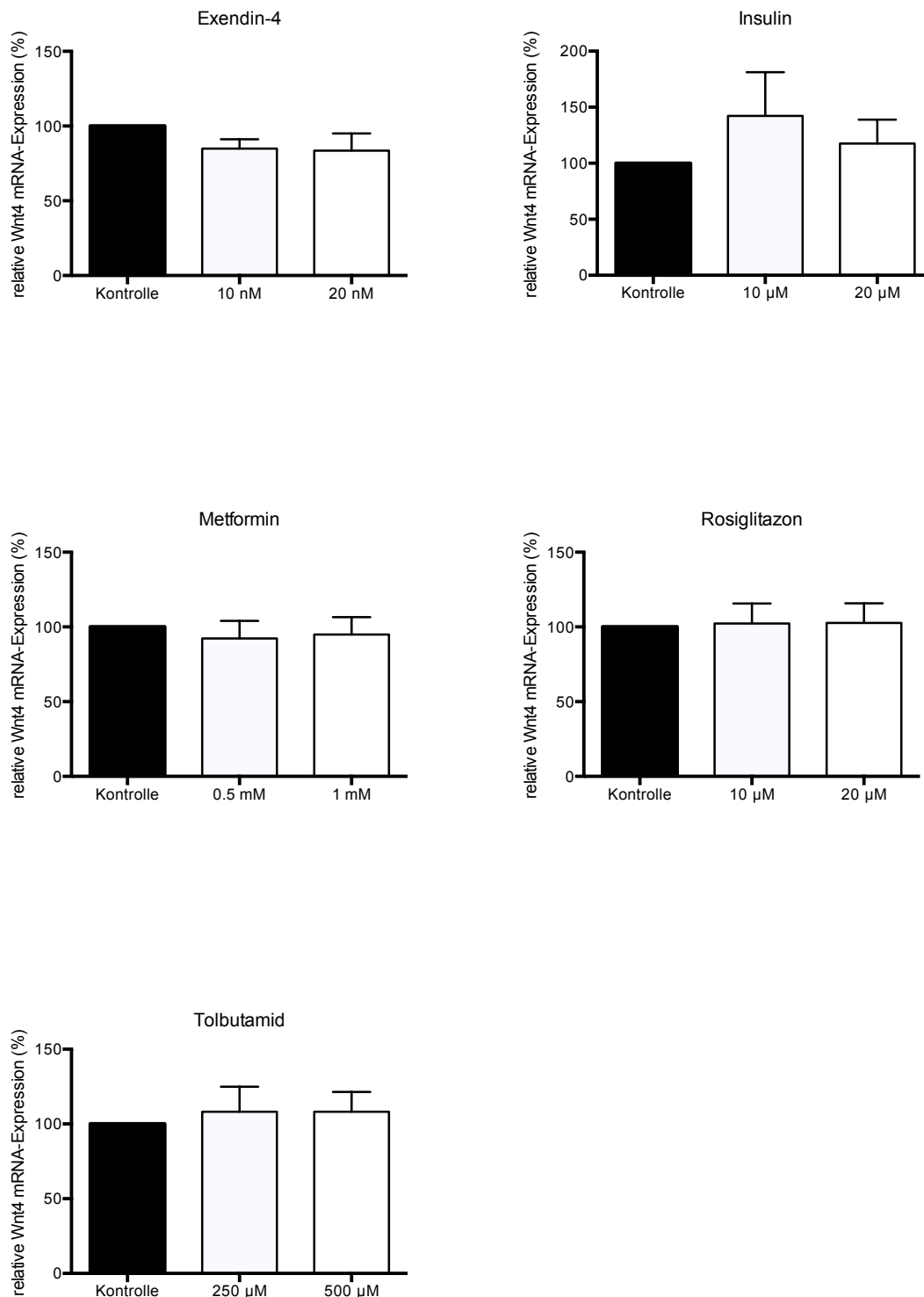
Murine GLUTag Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose senkenden Substanzen, wie im Methodikteil beschrieben, stimuliert.

- Metformin 500  $\mu$ M, 1 mM
- Tolbutamid 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M
- Rosiglitazon 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M
- Exendin-4 10 nM, 20 nM
- Insulin 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M

Nach 24 Stunden wurde die mRNA aus den stimulierten Zellen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression jeder einzelnen Probe wurde folglich mittels quantitativer PCR untersucht. Es wurde die mRNA-Expression der Wnt-Signalmoleküle von Wnt4 und TCF7L2 gemessen. Die Ergebnisse wurden in Relation zu den jeweils spezifischen Kontrollen gesetzt, die im Methodikteil näher erläutert wurden.

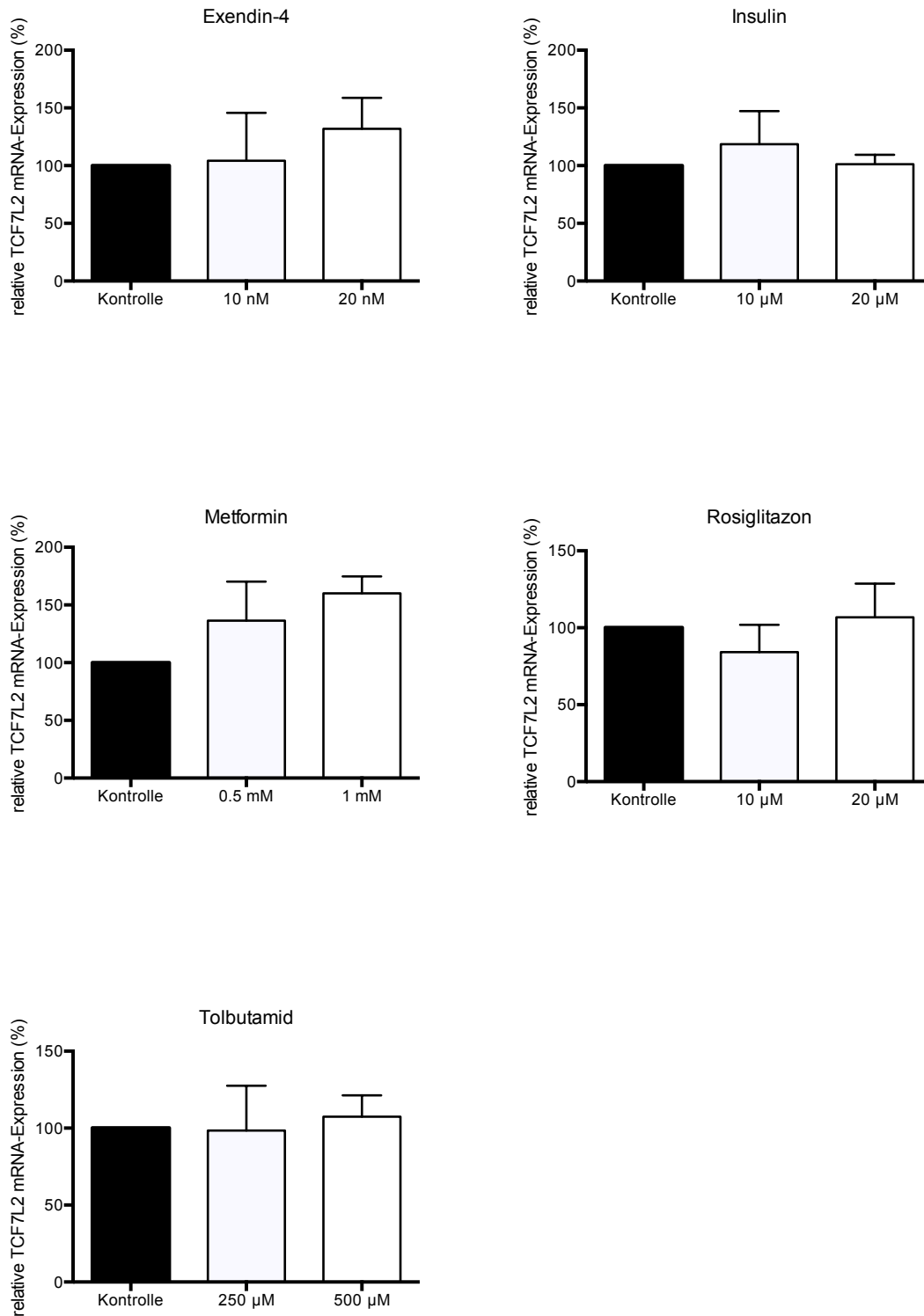
Die mRNA-Expression von Wnt4 und TCF7L2 wurde von keiner Glukose senkenden Substanz signifikant beeinflusst; auch nicht in unterschiedlichen Konzentrationen. Somit zeigte sich kein vermuteter regulatorischer Effekt auf die Wnt4- sowie auf die TCF7L2-Expression. Dies wird in Abbildung 10 und 11 verdeutlicht.

## Relative Wnt4 mRNA-Expression



**Abbildung 10:** Stimulation über 24 Stunden mit verschiedenen Glukose senkenden Substanzen zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Wnt4 mRNA-Expression. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung. DMSO stellt die Kontrolle zu Tolbutamid und HEPES die Kontrolle zu Insulin dar.

## Relative TCF7L2 mRNA-Expression



**Abbildung 11:** Stimulation über 24 Stunden mit verschiedenen Glukose senkenden Substanzen zeigten keinen signifikanten Effekt auf die TCF7L2-Gen-Expression. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung. DMSO stellt die Kontrolle zu Tolbutamid und HEPES die Kontrolle zu Insulin dar.

### 3.5 Regulation der mRNA-Expression von Wnt-Signalmolekülen durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen

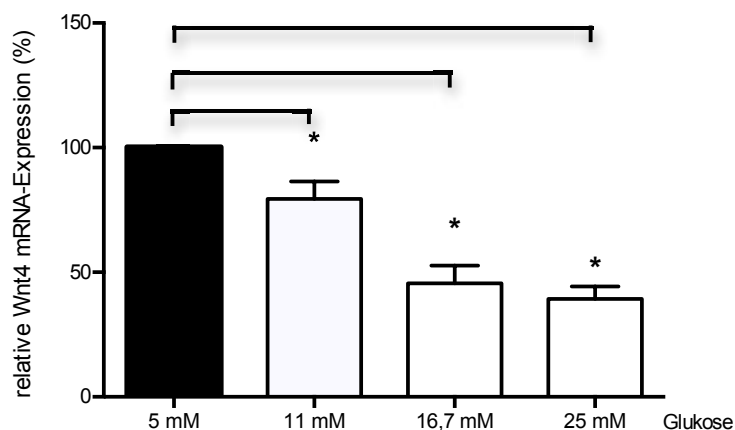
Murine GLUTag Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (11 mM, 16,7 mM, 25 mM) stimuliert. Dabei wurde die Glukosekonzentration von 5 mM als Kontrolle genommen, da 5 mM einen physiologischen Glukosespiegel darstellen (siehe Methodikteil).

Nach 24 Stunden der Stimulation mit Glukose wurde die mRNA aus den GLUTag Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. So konnte mittels quantitativer Real-Time PCR die mRNA-Expression für die Wnt-Signalmoleküle Wnt4 und TCF7L2 gemessen werden.

Es zeigte sich, dass hohe Glukosekonzentrationen die mRNA-Expression von Wnt4 und TCF7L2 in GLP-1 produzierenden GLUTag Zellen herunterregulieren. Die Gen-Expression von Wnt4 wurde nach 24 Stunden Stimulation einerseits bei einer Konzentration von 25 mM Glukose signifikant um 61% und andererseits bei einer Konzentration von 16,7 mM Glukose signifikant um 55% gesenkt.

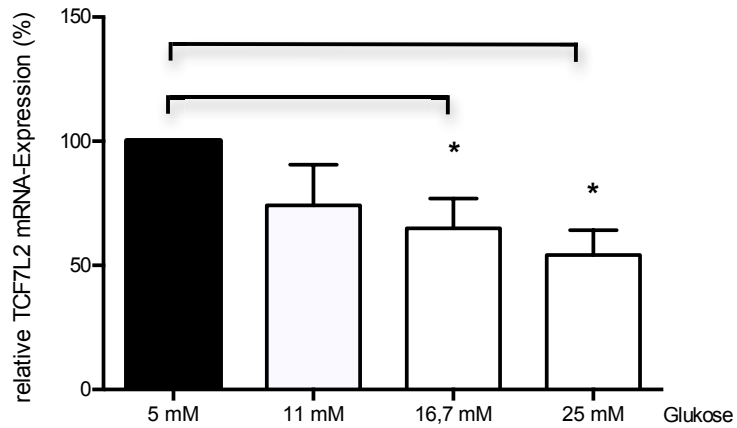
Die Gen-Expression von TCF7L2 wurde ebenfalls signifikant bei einer Konzentration von 25 mM (um 46%) und 16,7 mM (um 36%) gesenkt (Abbildung 12 und 13).

Hohe Glukosekonzentrationen führen zu einer Inhibierung der Expression der Wnt-Signalmoleküle Wnt4 und TCF7L2 in murinen GLUTag Zellen.



**Abbildung 12:** Wnt4-Gen-Expression. Stimulation über 24 Stunden mit verschiedenen Glukosekonzentrationen zeigten einen signifikanten Effekt auf die Wnt4-Gen-Expression. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen in

3-fach Bestimmung. Statistisch signifikant \*  $p \leq 0,05$ . 24 Stunden Stimulation mit 25 mM, 16,7 mM Glukose führte zu einer Inhibition von Wnt4 von 61% ( $p < 0.05$ ) und 55% ( $p < 0.05$ ) in Bezug auf die Kontrolle (5 mM).



**Abbildung 13:** TCF7L2-Gen-Expression. Stimulation über 24 Stunden mit verschiedenen Glukosekonzentrationen zeigten einen signifikanten Effekt auf die TCF7L2-Gen-Expression. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte in Prozent  $\pm$  SD von fünf voneinander unabhängigen Versuchen in 3-fach Bestimmung. Statistisch signifikant \*  $p \leq 0,05$ . 24 Stunden Stimulation mit 11 mM, 16,7 mM und 25 mM führten zu einer Inhibition von TCF7L2 von 26%, 36% ( $p < 0.05$ ) und 46% ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (5 mM).

## 4 Diskussion

Unsere aufgestellte Hypothese, dass hohe Glukosekonzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Expression von Wnt-Signalmolekülen in intestinalen L-Zellen haben, wurde durch die gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Der zweite Teil der Untersuchung zeigte keinen Effekt von Glukose senkenden Substanzen auf die Expression von Wnt Signalmolekülen in endokrinen intestinalen L-Zellen.

In dieser Arbeit wurden für die Versuchsreihen die Wnt-Signalmoleküle TCF7L2 und Wnt4 ausgewählt. TCF7L2 ist von besonderem Interesse, da einzelne Formen dieses Signalmoleküls die größte Gen-Disposition zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 besitzen.

Wnt4 vermittelt wie in der Arbeit von Heller et al beschrieben, eine proliferative Wirkung von GLP-1 auf  $\beta$ -Zellen des Pankreas in vitro.

Kurzfristig führen erhöhte Glukosespiegel im Organismus physiologisch zu einer vermehrten Sekretion von GLP-1.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können Erklärungen für einen erniedrigten chronischen GLP-1-Spiegel bei Typ 2 Diabetikern geben. Denn die aus den Experimenten ersichtlichen Ergebnisse zeigen, dass hohe Glukosespiegel zu einer herabgesetzten Expression von Wnt4 und TCF7L2 führen. Daraus kann eine verminderte Expression von GLP-1 resultieren.

Signifikante Ergebnisse ließen sich bei Stimulation mit ansteigenden Glukosekonzentrationen nachweisen. Diese führten nach 24 Stunden zu einer verminderten Expression von Wnt4 und TCF7L2. Die Wnt4-Expression wurde um annähernd die Hälfte und die des TCF7L2 um knapp mehr als die Hälfte in Bezug auf die Kontrolle inhibiert.

Der Abfall der Wnt4- und der TCF7L2-Expression war konzentrationsabhängig und zeigte sich am deutlichsten bei einer Glukosekonzentration von 25 mM.

Kurzfristig steigert Glukose die GLP-1 Freisetzung. Chronische Effekte sind aber unvollständig verstanden.

Vilsbøll publizierte 2001, dass der GLP-1 Spiegel im Gegensatz zum GIP Spiegel bei Personen mit einem Diabetes mellitus signifikant erniedrigt ist [57]. Die Ursache für

dieses Phänomen ist bisher nicht bekannt. Es existieren jedoch mehrere Erklärungsansätze.

So behaupteten Grant et al. 2006, dass ein TCF7L2 Polymorphismus, der mit der Entstehung eines Diabetes mellitus in Verbindung steht [8], auch einen verminderten Inkretinspiegel oder Inkretinwirkung verursachen kann [9].

Im Folgenden bietet unsere Arbeit einen weiteren möglichen Erklärungsansatz auf die o.g. Publikation von Vilsbøll aus dem Jahr 2001.

Bei Diabetikern ohne medikamentöse Behandlung liegt immer eine chronische Hyperglykämie vor. Es ist keine Seltenheit, dass Plasmaglukosespiegel von >11 mM (>200 mg/dl) vorliegen. Ab dieser Konzentration kommt es hier zu einem signifikanten Abfall der TCF7L2-Expression, die mittels PCR-Analysen gemessen wurde. Ein Absinken von TCF7L2 in intestinalen endokrinen L-Zellen bewirkt eine verminderte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs. Die Konzentration von endogenem GLP-1 könnte über diesen Mechanismus absinken. Die Inhibierung von TCF7L2 durch erhöhte Glukosespiegel könnte somit eine Ursache für den erniedrigten GLP-1 Spiegel bei Personen mit einem Diabetes mellitus Typ 2 sein.

In unserer Arbeit kam es neben der Inhibierung der TCF7L2 Expression bei Stimulation der GLUTag-Zellen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen auch zu einer verminderten Expression von Wnt4.

Die Expression und die Wirkung von Wnt4 wurde bisher nur vereinzelt in verschiedenen Geweben untersucht. 2011 beschrieben Bernardi et al., dass Wnt4, als eigentliches nicht-kanonisches Wnt, trotzdem über eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus von Muskelzellen führt [120].

2008 führten Bernard et al. Arbeiten an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) durch. Diese Gruppe zeigte, dass Wnt4 zu keiner Veränderung der basalen Wnt-Signalaktivität führte. Wnt4 vermittelte die Translokation von  $\beta$ -Catenin an die Zellmembran. Dadurch konnte  $\beta$ -Catenin nicht in den Nukleus translozieren und die Expression von Wnt-Zielgenen nicht aktivieren. So wurde Wnt4 eine Wnt-inhibierende Wirkung zugesprochen [121].

Heller et al. aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten die Rolle von Wnt4 in endokrinen  $\beta$ -Zellen. Wnt4 beeinflusste hier nicht die Transkription und nicht die



Sekretion von Insulin, sondern senkte die Expression von TNF- $\alpha$ . Hohe Spiegel von GLP-1 führten in der  $\beta$ -Zelle zu einer Steigerung der Expression von Wnt4. Aufgrund dieser Beobachtung gehen Heller et al. von einer durch Wnt4 vermittelten antiinflammatorischen und proliferativen Wirkung von GLP-1 auf  $\beta$ -Zellen aus [112]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung auf die Wnt4 Expression in L-Zellen untersucht.

Hohe Glukosespiegel führen in der vorliegenden Arbeit zu einer geringen Wnt4 Expression. Ob Wnt4 insgesamt zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der GLP-1 Spiegel im Blut führt, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend beurteilt werden.

Für die Hypothese einer verminderten Sekretion von GLP-1 sprechen die Ergebnisse von Heller. Hohe Glukosespiegel könnten aufgrund einer niedrigen Wnt4 Expression zu einer Erhöhung der Apoptose von L-Zellen führen. Letztlich könnte eine Verminderung der Anzahl der L-Zellen eine Erklärung für erniedrigte GLP-1 Spiegel bei Diabetikern sein [112].

Demgegenüber steht die Hypothese von Krützfeldt et al. Wnt4 fungiert hier in endokrinen  $\beta$ -Zellen des Pankreas als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs [122]. Ausgehend von dieser Hypothese würde bei Übertragung auf die L-Zelle eine Inhibierung der Wnt4 Expression durch hohe Glukosekonzentrationen zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führen, resultierend in einer vermehrten GLP-1 Sekretion.

Um die genaue Wirkung von Wnt4 zu klären, bedarf es weiterer Versuchsreihen. Für folgende Arbeiten wäre die Wirkung von Glukose auf die GLP-1 Sekretion nach Knockdown von TCF7L2 interessant.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Zellen mit Wnt3a stimuliert. Takada et al. [123] zeigte anhand einer Drosophila S2 Zelllinie eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Wnt3a. Entgegen dieser Arbeit konnte in der vorliegenden Arbeit kein aktivierender Effekt von Wnt3a auf den kanonischen Wnt-Signalweg in GLUTag Zellen nachgewiesen werden. Dadurch fehlt eine Erhöhung der Aktivierung der TOPflash-Transkription.

Dass in murinen GLUTag Zellen keine Aktivierung des  $\beta$ -Catenin/TCF-abhängigen Wnt-Signalwegs durch Stimulation mit Wnt3a vorzufinden ist, steht im Gegensatz zu

Befunden aus anderen Zellsystemen. Möglicherweise ist der endogene Spiegel von Wnt3a in GLUTag Zellen bereits supraphysiologisch. Jedoch kam es bei der in dieser Arbeit durchgeführten Stimulation mit *Fat cell-conditioned Medium* (FCCM), welches neben Wnt3a andere Signalmoleküle enthält, zu einer signifikanten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Möglich ist, dass andere Bestandteile aus FCCM wie Wnt10b zu einer Steigerung der TOPflash-Transkription führten [124].

Andererseits ist ein stark erhöhtes intrazelluläres Vorhandensein von Wnt3a in GLUTag Zellen denkbar, sodass eine Stimulation mit Wnt3a zu keiner weiteren Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs mehr führen kann.

In Studien mit Exendin-4 wurde gezeigt, dass dieses in  $\beta$ -Zellen den kanonischen Wnt-Signalweg aktiviert. In murinen  $\beta$ -Zellen führte eine Stimulation mit Exendin-4 zu einer Aktivierung des TCF-abhängigen kanonischen Wnt-Signalwegs. Beweisend dafür war ein Experiment mit TCF7L2- oder  $\beta$ -Catenin-Knockdown Inseln, bei denen der proliferationsfördernde Effekt nach Stimulation mit Exendin-4 auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen wegfiel [63].

Ein Einfluss von Exendin-4 auf die Expression von Wnt-Signalmolekülen in GLUTag Zellen konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden. Es führte weder zur Stimulierung noch Inhibierung der Expression von Wnt-Signalmolekülen in intestinalen endokrinen L-Zellen.

Der ausbleibende Effekt von Exendin-4 in der vorliegenden Arbeit lässt sich mit der Arbeit von Sangle et al. [111] vergleichen. Dort führte eine Stimulation von GLUTag-Zellen mit Exendin-4 zu keiner erhöhten Freisetzung von endogenen GLP-1, im Gegensatz zum DPP-IV-Inhibitor Sitagliptin. Sitagliptin führte auf einem DPP-IV unabhängigen Weg zu einer Erhöhung von GLP-1.

Zu vermuten ist in Sangle's und unserer Studie, dass die Dichte von GLP-1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von GLUTag-Zellen zu gering ist. Somit bleibt ein Effekt auf die Expression von endogenen Wnt-Signalmolekülen in unseren Experimenten aus.

Um genauere Aussagen über die Wirkung von Exendin-4 auf L-Zellen treffen zu können, sollten weitere Experimente mit einer Langzeitstimulation von Exendin-4 durchgeführt werden. Eine Änderung der verwendeten Zellen könnte auch zu neuen Erkenntnissen führen.

In Bezug auf die Glukose senkende Substanz Metformin zeigten Manucci et al. und Mulherin et al. anhand von Zelllinien, dass eine Langzeit Metformin Behandlung zu einer Erhöhung des GLP-1-Spiegels führt. Es ist bis heute nicht bekannt über welchen Mechanismus diese Wirkung zustande kommt.

Es wurden verschiedene Hypothesen über den Mechanismus aufgestellt. Eine der Hypothesen vermutete einen erhöhten GLP-1 Spiegel durch Inaktivierung der DPP-IV. Diese Hypothese erwies sich als falsch. Metformin beeinflusste nicht den GIP-Spiegel. Da GIP von der DPP-IV rapide abgebaut wird, müsste bei einer Hemmung der DPP-IV zusätzlich der Spiegel von GIP ansteigen [19, 125].

Kappe et al. konnten in einer Studie eine erhöhte GLP-1-Sekretion in GLUTag-Zellen durch eine Langzeitstimulation mit Metformin nachweisen. Diabetiker besitzen eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren, die zur Apoptose von GLP-1 sezernierenden Zellen führen. Metformin schützt dem Anschein nach diese Zellen vor der Lipoapoptose durch freie Fettsäuren. Außerdem wird eine direkte Wirkung von Metformin auf die L-Zellen vermutet. Für eine endgültige Aussage sind vor allem *in vivo* Studien gefordert [20].

Die von uns aufgestellte Hypothese sollte mögliche Aufschlüsse geben, ob Metformin durch eine Zunahme der Expression von Wnt-Signalmolekülen zu einer erhöhten GLP-1-Sekretion führt.

Metformin führte jedoch in keinem der ausgeführten Experimente zu einer signifikanten Expressionsveränderung von Wnt4 oder TCF7L2.

Eine Langzeitstimulation mit Metformin, vergleichbar mit Kappe et al., könnte weiterführende Ergebnisse erzielen [20].

Bezüglich Insulin veröffentlichte eine Gruppe um Yi 2008 in *in vitro* Experimenten unter anderem mit GLUTag Zellen, dass Insulin zu erhöhten GLP-1 Spiegeln führt. Unter anderem kam es zu einem Anstieg der  $\beta$ -Catenin Konzentration im Nukleus der Zelle. Dieses führte zu einer Komplexbildung mit TCF7L2. Dieser Komplex band an das *G2 Enhancer element* [26].

Dies bestätigte die Gruppe Liu et al. 2012, indem sie *in vivo* Experimente durchführten. Es kam in deren Experimenten zu einem signifikanten Anstieg des GLP-1. Jedoch ist der Mechanismus der GLP-1 Erhöhung bisher nicht bekannt [126].

In beiden erwähnten Studien kam es in den Versuchen zu einem Anstieg des nukleären  $\beta$ -Catenins. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Wirkung über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt wird.

In unseren Ergebnissen zeigte sich durch Insulin kein stimulierender oder inhibierender Effekt auf die Expression einzelner Wnt Signalmoleküle. Somit führte nicht die Stimulation der Expression von Wnt4 oder TCF7L2 zur Erhöhung des GLP-1 Spiegels. Auch hier sind weitere Nachforschungen anzustreben.

Im Zusammenhang mit den anderen untersuchten Glukose senkenden Substanzen gibt es keine aktuellen Forschungsdaten, die eine Verbindung zum Wnt-Signalweg herstellen.

Die in unserer Arbeit durchgeführten PCR-Analysen zeigen, dass die Wnt-Signalkomponenten Wnt4 und TCF7L2 durch die restlichen Glukose senkenden Substanzen dosisunabhängig nicht in ihrer Expression verändert werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit für die hier eingesetzten Glukose senkenden Substanzen kein signifikanter stimulierender oder hemmender Einfluss auf die Expression von Wnt-Signalmolekülen in murinen GLUTag-Zellen nachgewiesen werden.

Allerdings fand sich eine Hemmung der mRNA Expression der Wnt-Signalmoleküle TCF7L2 und Wnt4 in L-Zellen durch hohe Glukosespiegel. Dies könnte ein Mechanismus sein, der zum verminderten GLP-1 Spiegel bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus beiträgt.

## 5 Zusammenfassung

Die Arbeit zeigt, dass die Stimulation mit hohen Glukosekonzentrationen, wie sie bei Diabetikern vorliegen, die Expression einzelner Komponenten aus dem kanonischen Wnt-Signalweg in intestinalen endokrinen L-Zellen hemmen.

Die Stimulation der intestinalen L-Zellen mit verschiedenen ausgewählten Glukose senkenden Substanzen wie Metformin, Tolbutamid, Rosiglitazon, Exendin-4 und Insulin führen in verschiedenen Konzentrationen weder zu einer signifikanten Stimulation noch Inhibierung der Expression der Wnt-Signalmoleküle TCF7L2 und Wnt4.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass hohe Glukosekonzentrationen die endogene TCF7L2 und Wnt4 Expression in intestinalen endokrinen L-Zellen inhibieren. Es könnte ein Mechanismus für die erniedrigte GLP-1 Sekretion aus L-Zellen bei Diabetikern darstellen.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2010. **33 Suppl 1**: p. S62-9.
2. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2011. **94**(3): p. 311-21.
3. Inzucchi, S.E., et al., *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetes Care, 2012. **35**(6): p. 1364-79.
4. Herder, C. and M. Roden, *Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance*. European journal of clinical investigation, 2011. **41**(6): p. 679-92.
5. Kolb, H. and T. Mandrup-Poulsen, *The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation*. Diabetologia, 2010. **53**(1): p. 10-20.
6. Yach, D., D. Stuckler, and K.D. Brownell, *Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes*. Nature medicine, 2006. **12**(1): p. 62-6.
7. Newman, B., et al., *Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins*. Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 763-8.
8. Florez, J.C., et al., *TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program*. The New England journal of medicine, 2006. **355**(3): p. 241-50.
9. Grant, S.F., et al., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. Nature genetics, 2006. **38**(3): p. 320-3.
10. Lyssenko, V., et al., *Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(8): p. 2155-63.
11. Pearson, E.R., *Translating TCF7L2: from gene to function*. Diabetologia, 2009. **52**(7): p. 1227-30.
12. Schafer, S.A., et al., *Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2443-50.
13. *Standards of medical care in diabetes--2011*. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 1**: p. S11-61.
14. Matthaei, S., et al., *Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2011. **6**: p. S105-S206.
15. Perriello, G., et al., *Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production*. Diabetes, 1994. **43**(7): p. 920-8.
16. Hundal, R.S., et al., *Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2063-9.
17. Sajjan, M.P., et al., *AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of*

- atypical PKC*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2010. **298**(2): p. E179-92.
18. Maida, A., et al., *Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice*. Diabetologia, 2011. **54**(2): p. 339-49.
  19. Mulherin, A.J., et al., *Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell*. Endocrinology, 2011. **152**(12): p. 4610-9.
  20. Kappe, C., et al., *Metformin protects against lipoapoptosis and enhances GLP-1 secretion from GLP-1-producing cells*. Journal of gastroenterology, 2013. **48**(3): p. 322-32.
  21. Del Prato, S. and N. Pulizzi, *The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus*. Metabolism: clinical and experimental, 2006. **55**(5 Suppl 1): p. S20-7.
  22. Nissen, S.E. and K. Wolski, *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes*. The New England journal of medicine, 2007. **356**(24): p. 2457-71.
  23. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
  24. Schinner, S., et al., *Molecular mechanisms of insulin resistance*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association, 2005. **22**(6): p. 674-82.
  25. Holman, R.R., et al., *10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes*. The New England journal of medicine, 2008. **359**(15): p. 1577-89.
  26. Yi, F., et al., *Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2341-51.
  27. Nauck, M.A., et al., *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1986. **63**(2): p. 492-8.
  28. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
  29. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, *The mechanism of pancreatic secretion*. The Journal of physiology, 1902. **28**(5): p. 325-53.
  30. Starling, E.H., *The Croonian Lectures on the chemical correlation of the functions of the body*. The Lancet, 1905. **166**(4275): p. 339-341, 423-425, 501-503, 579-583.
  31. La Barre, J., *Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine*. Bull Acad R Med Belg, 1932. **12**: p. 620-634.
  32. Elrick, H., et al., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1964. **24**: p. 1076-82.
  33. McIntyre, N., C.D. Holdsworth, and D.S. Turner, *New interpretation of oral glucose tolerance*. The Lancet, 1964. **284**(7349): p. 20-21.
  34. Perley, M.J. and D.M. Kipnis, *Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects*. The Journal of Clinical Investigation, 1967. **46**: p. 1954-1962.
  35. Unger, R.H. and A.M. Eisentraut, *Entero-insular axis*. Archives of Internal Medicine, 1969. **123**(3): p. 261-6.
  36. Creutzfeldt, W., *The incretin concept today*. Diabetologia, 1979. **16**(2): p. 75-85.

37. Creutzfeldt, W., G. Feurle, and H. Ketterer, *Effect of Gastrointestinal Hormones on Insulin and Glucagon Secretion*. New England Journal of Medicine, 1970. **282**(20): p. 1139-1141.
38. Brown, J.C., V. Mutt, and R.A. Pederson, *Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity*. The Journal of physiology, 1970. **209**(1): p. 57-64.
39. Dupre, J., et al., *Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1973. **37**(5): p. 826-8.
40. Lauritsen, K.B., et al., *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release after small-bowel resection in man*. Scand J Gastroenterol, 1980. **15**(7): p. 833-40.
41. Bell, G.I., et al., *Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene*. Nature, 1983. **304**(5924): p. 368-71.
42. Inagaki, N., et al., *Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene*. Molecular Endocrinology, 1989. **3**(6): p. 1014-21.
43. Ugleholdt, R., et al., *Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(16): p. 11050-7.
44. Buchan, A.M., et al., *Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cell as the source of CCK*. Gut, 1978. **19**(5): p. 403-7.
45. Mortensen, K., et al., *GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine*. Regulatory peptides, 2003. **114**(2-3): p. 189-96.
46. Elliott, R.M., et al., *Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns*. The Journal of endocrinology, 1993. **138**(1): p. 159-66.
47. Deacon, C.F., A.H. Johnsen, and J.J. Holst, *Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1995. **80**(3): p. 952-7.
48. Nauck, M.A., B. Baller, and J.J. Meier, *Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S190-6.
49. White, J.W. and G.F. Saunders, *Structure of the human glucagon gene*. Nucleic acids research, 1986. **14**(12): p. 4719-30.
50. Eissele, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man*. European journal of clinical investigation, 1992. **22**(4): p. 283-91.
51. Dhanvantari, S., N.G. Seidah, and P.L. Brubaker, *Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon*. Molecular Endocrinology, 1996. **10**(4): p. 342-55.
52. Orskov, C., et al., *Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans*. Diabetes, 1994. **43**(4): p. 535-9.
53. Brubaker, P.L., *The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1070**: p. 10-26.
54. Herrmann, C., et al., *Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients*. Digestion, 1995. **56**(2): p. 117-26.



55. Balks, H.J., et al., *Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1997. **82**(3): p. 786-90.
56. Rocca, A.S. and P.L. Brubaker, *Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion*. Endocrinology, 1999. **140**(4): p. 1687-94.
57. Vilsboll, T., et al., *Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients*. Diabetes, 2001. **50**(3): p. 609-13.
58. Kieffer, T.J., C.H. McIntosh, and R.A. Pederson, *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV*. Endocrinology, 1995. **136**(8): p. 3585-96.
59. Meier, J.J., et al., *Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 654-62.
60. Mayo, K.E., et al., *International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family*. Pharmacological reviews, 2003. **55**(1): p. 167-94.
61. Drucker, D.J., et al., *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(10): p. 3434-8.
62. Cornu, M. and B. Thorens, *GLP-1 protects beta-cells against apoptosis by enhancing the activity of an IGF-2/IGF1-receptor autocrine loop*. Islets, 2009. **1**(3): p. 280-2.
63. Liu, Z. and J.F. Habener, *Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(13): p. 8723-35.
64. Zander, M., et al., *Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study*. Lancet, 2002. **359**(9309): p. 824-30.
65. Nauck, M.A., *Unraveling the science of incretin biology*. European journal of internal medicine, 2009. **20 Suppl 2**: p. S303-8.
66. Herman, G.A., et al., *Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2006. **91**(11): p. 4612-9.
67. Schweizer, A., et al., *Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA1c over 1 year in drug-naïve patients with Type 2 diabetes*. Diabetic Medicine, 2007. **24**(9): p. 955-961.
68. Eng, J., et al., *Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(11): p. 7402-5.
69. Buse, J.B., et al., *Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(11): p. 2628-35.
70. DeFronzo, R.A., et al., *Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1092-100.

71. Kendall, D.M., et al., *Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(5): p. 1083-91.
72. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 99-109.
73. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. *Nature*, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
74. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. *Cell*, 1987. **50**(4): p. 649-57.
75. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2004. **20**: p. 781-810.
76. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
77. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. *Nature*, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
78. Franch-Marro, X., et al., *In vivo role of lipid adducts on Wingless*. *Journal of cell science*, 2008. **121**(Pt 10): p. 1587-92.
79. Wong, G.T., B.J. Gavin, and A.P. McMahon, *Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes*. *Molecular and cellular biology*, 1994. **14**(9): p. 6278-86.
80. Du, S.J., et al., *Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos*. *Molecular and cellular biology*, 1995. **15**(5): p. 2625-34.
81. van Amerongen, R., A. Mikels, and R. Nusse, *Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors*. *Science signaling*, 2008. **1**(35): p. re9.
82. van Amerongen, R. and R. Nusse, *Towards an integrated view of Wnt signaling in development*. *Development*, 2009. **136**(19): p. 3205-14.
83. Bhanot, P., et al., *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 225-30.
84. Dann, C.E., et al., *Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains*. *Nature*, 2001. **412**(6842): p. 86-90.
85. Tamai, K., et al., *LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 530-5.
86. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. *Nature*, 2005. **438**(7069): p. 873-7.
87. Zeng, L., et al., *The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation*. *Cell*, 1997. **90**(1): p. 181-92.
88. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *Journal of cell science*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
89. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 391-9.
90. Schinner, S., et al., *Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease*. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 2009. **160**(5): p. 731-7.
91. Yi, F., P.L. Brubaker, and T. Jin, *TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta*. *The Journal of biological chemistry*, 2005. **280**(2): p. 1457-64.

92. Ni, Z., et al., *Transcriptional activation of the proglucagon gene by lithium and beta-catenin in intestinal endocrine L cells*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(2): p. 1380-7.
93. Kanazawa, A., et al., *Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes*. American journal of human genetics, 2004. **75**(5): p. 832-43.
94. Saxena, R., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
95. Scott, L.J., et al., *A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1341-5.
96. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
97. Chang, Y.C., et al., *Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population*. Diabetes, 2007. **56**(10): p. 2631-7.
98. Hayashi, T., et al., *Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population*. Diabetologia, 2007. **50**(5): p. 980-4.
99. Lehman, D.M., et al., *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, 2007. **56**(2): p. 389-93.
100. Wegner, L., et al., *Impact of TCF7L2 rs7903146 on insulin secretion and action in young and elderly Danish twins*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2008. **93**(10): p. 4013-9.
101. Lyssenko, V., *The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2008. **11**(4): p. 385-92.
102. Pilgaard, K., et al., *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, 2009. **52**(7): p. 1298-307.
103. Villareal, D.T., et al., *TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 479-85.
104. Philippe, J., *Glucagon gene transcription is negatively regulated by insulin in a hamster islet cell line*. The Journal of Clinical Investigation, 1989. **84**(2): p. 672-7.
105. Philippe, J., *Insulin regulation of the glucagon gene is mediated by an insulin-responsive DNA element*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(16): p. 7224-7.
106. Lee, Y.C., S.L. Asa, and D.J. Drucker, *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*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(15): p. 10705-8.
107. Drucker, D.J., et al., *Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line*. Molecular Endocrinology, 1994. **8**(12): p. 1646-55.
108. Brubaker, P.L., J. Schloos, and D.J. Drucker, *Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4108-14.
109. Hagen, T., et al., *Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments*. The Biochemical journal, 2004. **379**(Pt 2): p. 471-7.

110. Natalicchio, A., et al., *Exendin-4 prevents c-Jun N-terminal protein kinase activation by tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) and inhibits TNFalpha-induced apoptosis in insulin-secreting cells*. *Endocrinology*, 2010. **151**(5): p. 2019-29.
111. Sangle, G.V., et al., *Novel biological action of the dipeptidylpeptidase-IV inhibitor, sitagliptin, as a glucagon-like peptide-1 secretagogue*. *Endocrinology*, 2012. **153**(2): p. 564-73.
112. Heller, C., et al., *Exendin-4 upregulates the expression of Wnt-4, a novel regulator of pancreatic beta-cell proliferation*. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2011. **301**(5): p. E864-72.
113. Lim, G.E., et al., *Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell*. *Endocrinology*, 2009. **150**(2): p. 580-91.
114. Lim, G.E., et al., *The rho guanosine 5'-triphosphatase, cell division cycle 42, is required for insulin-induced actin remodeling and glucagon-like peptide-1 secretion in the intestinal endocrine L cell*. *Endocrinology*, 2009. **150**(12): p. 5249-61.
115. Kappe, C., et al., *Metformin protects against lipoapoptosis and enhances GLP-1 secretion from GLP-1-producing cells*. *Journal of gastroenterology*, 2012.
116. Kim, H.S., et al., *Rosiglitazone stimulates the release and synthesis of insulin by enhancing GLUT-2, glucokinase and BETA2/NeuroD expression*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008. **367**(3): p. 623-9.
117. Reimann, F. and F.M. Gribble, *Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells*. *Diabetes*, 2002. **51**(9): p. 2757-63.
118. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *Journal of molecular endocrinology*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
119. Wacker, M.J. and M.P. Godard, *Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III*. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 2005. **16**(3): p. 266-71.
120. Bernardi, H., et al., *Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2011. **300**(5): p. C1122-38.
121. Bernard, P., et al., *Wnt4 inhibits beta-catenin/TCF signalling by redirecting beta-catenin to the cell membrane*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 2008. **100**(3): p. 167-77.
122. Krutzfeldt, J. and M. Stoffel, *Regulation of wingless-type MMTV integration site family (WNT) signalling in pancreatic islets from wild-type and obese mice*. *Diabetologia*, 2010. **53**(1): p. 123-7.
123. Takada, R., et al., *Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2005. **10**(9): p. 919-28.
124. Schinner, S., et al., *Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway*. *International journal of obesity*, 2007. **31**(5): p. 864-70.
125. Mannucci, E., et al., *Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects*. *Diabetes Care*, 2001. **24**(3): p. 489-94.

126. Liu, S., et al., *Insulin detemir enhances proglucagon gene expression in the intestinal L cells via stimulating beta-catenin and CREB activities*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2012. **303**(6): p. E740-51.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. med. Sven Schinner danke ich außerordentlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe „Diabetes mellitus Typ 2“ anzufertigen. Für seine stetige Unterstützung bin ich Ihm sehr dankbar.

Besonders danken möchte ich auch der Klinik der Endokrinologie und Diabetologie ohne dessen finanzielle Mittel die Durchführung Dissertation gar nicht erst möglich gewesen wäre.

Großen Dank möchte ich auch den Personen aussprechen, die mir tatkräftig im Labor zur Seite gestanden haben und mir bei Fragen mehr als weitergeholfen haben. Außerdem habt Ihr mir einen abwechslungsreichen Alltag im Labor mit viel Spaß beschert. Vielen Dank Birgit, Fatma, Charlotte, Markus, Margret, Claudia, Roswitha, Pascal und Ursula.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie. Danke für Eure Unterstützung, Geduld und Motivation.

Schön, dass es Euch gibt.

## 8 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.

---

Ort und Datum

---

Vor- und Nachname

---

Unterschrift