

**Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. Dieter Häussinger**

Einflüsse von Insulin, der atypischen Proteinkinase C und Gallensäuren auf die Aktivität der Glucokinase in Ratten- Hepatozyten

Dissertation

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

vorgelegt von
Christian Song Ung Johannes Lauermann

2017

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Prof. Matthias Schott

GEWIDMET MEINER GROßMUTTER MARTHA LAUERMANN

*„ Wahrlich, es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,
nicht das Besitzen, sondern das Erwerben,
nicht das Dasein, sondern das Hinkommen,
was den größten Genuß gewährt.“ (Carl Friedrich Gauss 1777 - 1855)*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	10
1.1. Die atypischen Proteinkinase C (aPKC) Isoformen	10
1.1.1. Funktionen der aPKC	11
1.2. Glucokinase (GK)	15
1.2.1. Die besondere Kinetik der GK, der „Glucose-Sensor“	15
1.2.2. Aufbau der GK	16
1.2.3. Regulation der Glucokinase	17
1.2.4. Wechselwirkung mit dem GK-regulatorischen Protein (GKRP)	17
1.2.5. Pathologie und therapeutische Möglichkeiten	19
1.2.6. Die Glucose-6-Phosphatase, der Gegenspieler der GK	21
1.3. Gallensäuren beeinflussen den Glucosestoffwechsel	21
1.4. Fragestellung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. Materialien	24
2.1.1. Geräte	24
2.1.2. Verwendete Kit-Systeme	24
2.1.3. Chemikalien	24
2.1.4. Verwendete Antikörper	25
2.1.4.1. Primär-Antikörper	25
2.1.4.2. Sekundär-Antikörper und Fluoreszenz-Farbstoffe	25
2.1.5. Isolierte Zellen	25
2.1.6. Materialien für die PCR und qRT-PCR	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellkultur: Isolierung und Kultivierung von primären Hepatozyten	26
2.2.2. Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qRT-PCR)	27
2.2.2.1. Medienwechsel und Inkubation	27
2.2.2.2. RNA Isolation	28

2.2.2.3. Reverse Transkription von mRNA in cDNA	28
2.2.2.4. Primerdesign und Primer-Kontrolle mittels PCR	29
2.2.2.5. Durchführung der qRT-PCR	30
2.2.3. Immunfluoreszenzen	31
2.2.3.1. Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll	31
2.2.3.2. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	32
2.2.3.3. Auswertung und Analyse der Immunfluoreszenzen	32
3. ERGEBNISSE	35
3.1. DNA Microarray, Inhibition der GK-Expression durch myristolisiertes Pseudosubstrat	35
3.2. Quantitative <i>Realtime</i> -PCR	36
3.2.1. Versuchsvorbereitungen	36
3.2.2. Die mRNA Synthese der GK wird nicht durch die Gabe des Pseudo- substrats gehemmt; Steigerung der mRNA Expression der GK und Repression der Glucose-6-Phosphatase Expression durch Insulin	37
3.2.3. Die mRNA- Expression des GKRP wird nicht durch Insulin beeinflusst	39
3.3. Immunfluoreszenzen	40
3.3.1. Glucoseabhängige Translokation der GK, ein Dosis-abhängiger Effekt	41
3.3.2. Sorbitol aktiviert die Translokation der GK aus dem Zellkern ins Zytoplasma	42
3.3.3. Automatisierte Bildauswertung zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen	42
3.3.4. Insulin hat keinen aktivierenden Effekt auf die Translokation der GK	45
3.3.5. Die Verwendung von Summenhäufigkeitshistogrammen verdeutlicht die Translokation durch eine Verschiebung der Verteilungskurve	47
3.3.6. Einfluss der Gallensäuren auf die Kinetik der Translokation der GK	47
3.3.6.1. Die konjugierten Gallensäuren CDCA und GCDC haben keinen Einfluss auf die Translokation der GK	48
4. DISKUSSION	49
4.1. Die Inhibierung der aPKC ζ hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der GK	49
4.2. Insulin stimuliert die Expression der GK und inhibiert die Expression der G-6-Pase	50
4.3. Einflüsse auf die Translokation der Glucokinase zwischen Zellkern und Zytoplasma	51
4.3.1. Die Hemmung der aPKC hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK	51

4.3.2. Die Stimulation durch Insulin bewirkt keine Aktivierung der Translokation der GK	52
4.3.3. Sorbitol ist ein starker Aktivator der Translokation	53
4.4. Automatisierte Bildauswertung zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen, die Translokation der GK zur Etablierung einer Methode	54
4.4.1. Gallensäuren regulieren den Glucose-Stoffwechsel, CDCA hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
REFERENZEN	58
DANKSAGUNG	68

Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

Abb. 1:	Der Aufbau der verschiedenen PKC Subfamilien	11
---------	--	----

Ergebnisse:

Abb. 2:	Auswertungsbeispiel mit Hilfe Zeta Batch UKD Configuration Manager beta V 1.0	34
Abb. 3:	C _T -Werte der GK nach Stimulation mit Insulin [100nM] bzw. dem Pseudosubstrat [25µM] für zwei Stunden	37
Abb. 4:	Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin in An- oder Abwesenheit des PS nach Normalisierung der GK in Bezug auf das Housekeeping-Gen GUS	38
Abb. 5:	Repression der mRNA-Synthese der G-6-Pase durch Insulin (100nM)	38
Abb. 6:	Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin in An- oder Abwesenheit des PS nach Normalisierung der G-6-Pase in Bezug auf das Housekeeping-Gen GUS	39
Abb. 7:	Analyse der C _T -Werte für GKRP nach Stimulation mit Insulin	39
Abb. 8:	Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin nach Normalisierung des GKRP in Bezug auf das Housekeeping-Gen GUS	40
Abb. 9:	Eine steigende Glucosekonzentration im Medium bedingt die Translokation der GK aus dem Zellkern in das Zytoplasma	41
Abb. 10:	Immunfärbung der Glucokinase in primären Ratten-Hepatozyten nach Stimulation der Zellen mit Glucose oder Glucose und Sorbitol	42
Abb. 11:	Messung der Fluoreszenzsignale mit dem Zeta Batch UKD Configuration Manager V 1.0	43
Abb. 12:	Einfluss der Glucosekonzentration auf die Lokation der Glucokinase	44
Abb. 13:	Sorbitol [500 µM] bedingt eine Steigerung der Translokation aus dem Zellkern ins Zytoplasma	44
Abb. 14:	Insulin hat keinen signifikanten Effekt auf die Translokation aus dem Zellkern ins Zytoplasma	45
Abb. 15:	Die αPKC haben keinen Einfluss auf die Glucose-induzierte Translokation der GK	46

Abb. 16:	AICAR hat einen inhibierenden Einfluss auf die Glucose-induzierte Translokation der Glucokinase	46
Abb. 17:	Einfluss von Sorbitol auf die Translokation der GK	47
Abb. 18:	Die Gallensäure CDCA hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK	48
Abb. 19:	Schematische Darstellung der Umwandlung von Glucose in Sorbitol	53

Abkürzungsverzeichnis:

ABC = *ATP binding cassette*

AICAR = 5-Amino -imidazole-4-carboxamide

AK= Antikörper

AMPK = *5-AMP-activated protein kinase*

aPKC = atypische Proteinkinase C

AR = Aldosereduktase

ATP= Adenosintriphosphat

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA = Bovines Serum Albumin

BSEP= *Bile Salt Export Pump*

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CDS = Codierende Sequenzen

C_T = *Cycle Treshold*

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonucleinsäure

DPP4 = Dipeptidylpeptidase 4

ECL = *Enhanced chemiluminescent substrate*

ER = Endoplasmatisches Retikulum

F-1-P = Fructose-1-Phosphat

FCS = *Fetal Calf Serum*

FXR = Farnesoid-X-Rezeptor

G6P = Glucose-6-Phosphat

G-6-Pase = Glucose-6-Phosphatase

GCDC = Glycochenodeoxycholat

GK/GCK= Glucokinase

GKA = Glucokinase Aktivatoren
GKRP/GCKR= *Glucokinase Regulatory Protein*
GLP-1 = *Glucagon like Peptide-1*
GLUT= Glucosetransporter
GUS = Beta-Glucoronidase
HPRT = Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase
HRE = *Hypoxia responsive Element*
IRS = Insulinrezeptorsubstrat
I κ B α = *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*
KG = Körpergewicht
KHP = Krebs-Henseleit-Puffer
Km-Wert = Michaeliskonstante
MAP = *Mitogen-activated protein*
MDR 3= *Multidrug resistance protein 3*
MG = Molekulargewicht
MODY-2 = *maturity-onset diabetes of the young*
MRP 2 = *Multidrug resistance associated protein*
NES = *Nuclear export signal*
NF κ B = *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NLS = *Nuclear localization signal*
NTCP = *Natrium-taurocholate cotransporting polypeptide*
PBS = *Phosphate buffered saline* (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR = Polymerase-Kettenreaktion
PDI = Proteindisulfid-Isomerase
PDK-1 = *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*
PFK-2 = Phosphofruktokinase 2
PHHI = *persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy*
PI3-Kinase = Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3 = Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKC = Proteinkinase C
PS = Pseudosubstrat
Ras = G-Protein Ras (Rat sarcoma)
qRT-PCR = quantitative Realtime-(reverse-Transkriptase) PCR

RT = Reverse Transkriptase

RNA = Ribonucleinsäure

SREBP-1c = *Sterol regulatory element-binding protein 1c*

SRE = *Sterol Regulatory Element*

TCA = Taurocholsäure

TCDC = Taurochenodesoxycholat

TGR-5 = *Transmembrane G protein-coupled bile acid receptor*

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Die atypischen Proteinkinase C (aPKC) Isoformen

Proteinkinasen der Gruppe C (PKC) sind wichtige Enzyme intrazellulärer Signalkaskaden und spielen bei vielen verschiedenen Vorgängen und Reaktionen innerhalb verschiedener Zellreihen eine bedeutende Rolle. Es sind bis dato drei Gruppen der Proteinkinasen C bekannt, die abhängig vom Aktivierungssignal eingeteilt werden, dazu gehören die klassischen (conventional) PKCs (α , β I, β II and γ), die novel PKCs (δ , ϵ , η und θ) und die atypischen PKCs (ζ und ι/λ , humane PKC ι und Maus PKC λ sind ortholog). Der unterschiedliche Aufbau der einzelnen Proteinkinasen C Subtypen und deren Untereinheiten bestimmen dabei die Aktivierung wie in Abbildung 1 dargestellt, so erfolgt z.B. die Bindung von Diacylglycerin und dem Pseudosubstrat an die C1A/C1B Bindungsstellen, die gleichermaßen bei den konventionellen und den novel PKCs vorkommen. Calcium bindet an das C2-Motiv, welches Teil der konventionellen PKCs ist. Die atypischen PKCs sind aufgrund dieser fehlenden Domänen DAG und Ca²⁺ insensitiv, die Aktivierung erfolgt über Lipide wie z.B. Phosphatidylinositol, Arachnidonsäure und Ceramid (Moscat und Diaz Meco 2000).

Die aPKCs verfügen über ein sogenanntes Pseudosubstrat (PS), als Bestandteil des Proteins, das durch die Bindung an die Substratbindungsstelle eine vollständige Inaktivierung des Enzyms bewirkt. Die PS-Sequenz befindet sich im N-terminalen Bereich, wo sich ebenfalls ein cysteinreiches Zinkfinger-Motiv befindet. Die katalytische Kinase-Domäne befindet sich im C-terminalen Teil. Der genaue Aktivierungsweg der atypischen PKCs ist bis dato nicht bis ins Detail geklärt. Sie erfolgt über die Bindung eines Liganden an einen Tyrosinkinase-Rezeptor und damit verbundener Phosphorylierung der Tyrosinreste. Diese interagieren mit der p85 Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase), was wiederum eine Aktivierung der PI3-Kinase bedingt. Dies führt zur Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3) und einer konsekutiven Aktivierung der *3-phosphoinositide-dependent*

protein kinase-1 (PKC-1) und damit zur Phosphorylierung und Lösung des Pseudosubstrats von der Substratbindungsstelle der aPKCs. Zudem bewirkt die Bindung von PIP3 an den cysteinreichen N-Terminus der aPKC eine Konformationsänderung, welche die Umlagerung des Pseudosubstrates begünstigt. Durch die Freilegung der Bindungsstelle der aPKCs kommt es zu deren Aktivierung. (Suzuki et al. 2001; Standaert et al. 2001).

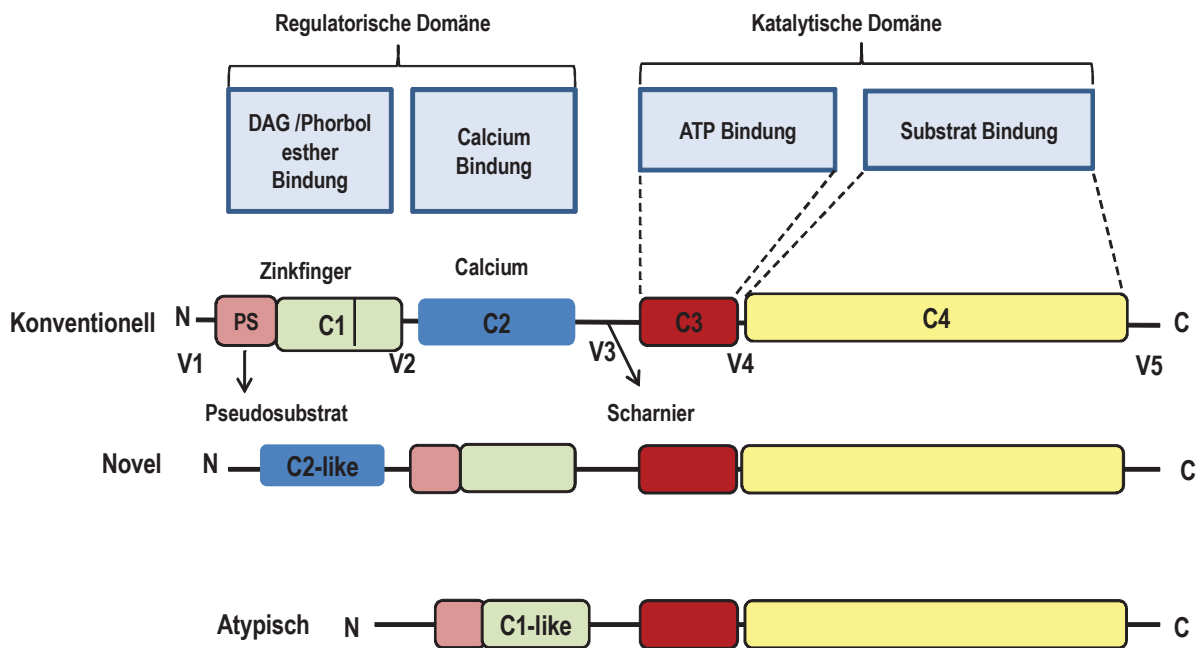


Abbildung 1 Der Aufbau der verschiedenen PKC Subfamilien. (adaptiert von: Mackay H & Twelves CJ, Targeting the protein kinase C family: are we there yet? Nature Reviews Cancer 2008, PS = Pseudosubstat)

1.1.1. Funktionen der aPKC

Mittlerweile sind mehrere wichtige Funktionen der atypischen PKCs bei intrazellulären Signalwegen bekannt. So sind sie an der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in Myozyten und Adipozyten durch den Einbau des Glucosetransporters GLUT-4 beteiligt, Insulin bewirkt hierbei den Einbau des Glucosetransporters in die Zellmembran, maßgeblich durch den Umbau von Actinfilamenten (Bandyopadhyay et al. 1999). Die GLUT-4 Transporter befinden sich bei niedrigen Blutglucosespiegeln inaktiviert innerhalb der Zellen in Vesikeln. Diese sind ausschließlich in Skelettmuskel-/Herzmuskelzellen und Adipozyten lokalisiert. Kommt es zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels bei Nahrungsaufnahme und damit verbundener Insulinausschüttung durch die β -Zellen des Pankreas, bewirkt dies einen Einbau der GLUT-4 Transporter in die Plasmamembran, hierdurch wird der Glucose-Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten um ein Vielfaches beschleunigt und die Bildung von

Glycogen aktiviert. Die aPKC ist dabei ein Downstream-Target des IRS-PI3-Kinase Signalwegs und wird über die o.g. Konformationsänderung und Phosphorylierung durch die PDK1 und PIP3 aktiviert. Knockout-Experimente der aPKC λ konnten zeigen, dass der insulinabhängige Glucosetransport in Myozyten und Adipozyten bei Knockout-Mäusen signifikant kompromittiert ist und dies zu einer Diabetes mellitus ähnlichen Stoffwechsellage führt (Farese et al. 2014). Auf der anderen Seite scheint die aPKC ebenfalls einen negativen Feedback-Mechanismus auf die insulinabhängige Aktivierung der PI3-Kinase durch das IRS zu besitzen und den damit verbundenen Einbau der Glucosetransporter durch eine Phosphorylierung von IRS-1 (an der Serin 318 Phosphorylierungsstelle) (Moeschel et al. 2004). Ebenso bewirkt die aPKC λ eine Translokation des GLUT-1 Transporters in die Plasmamembran von Adipozyten, der insulinunabhängig einen Einstrom von Glucose in die Zellen begünstigt (Bosch et al 2004).

Interessanterweise führt körperliche Aktivität und Muskelarbeit ebenfalls zu einem vermehrten Einbau von GLUT-4 Transportern in die Plasma-Membran von Skelettmuskelzellen. Die Muskelarbeit führt zu einer Aktivierung der AMPK (*5-AMP-activated protein kinase*), die für den Einbau der GLUT-4 Transporter in die Plasmamembran essentiell zu sein scheint. Es konnte gezeigt werden, dass AICAR, ein Aktivator der AMPK, ebenfalls zu einer Aktivierung der aPKCs führt (Chen et al. 2002) und damit die GLUT-4 Translokation fördert. Das Antidiabetikum Metformin ist ebenfalls ein Aktivator der AMPK. Mausmodell-Analysen legen nahe, dass eine Wirkung des Metformins die Aktivierung der aPKCs und der damit erhöhten Insulinsensitivität sein könnte (White 2009; Zhou et al. 2001).

Der genaue Vorgang, der dem Einbau der GLUT-4 Transporter zu Grunde liegt ist bisher nicht geklärt. Viele Hinweise deuten darauf hin, dass die aPKC an dem Actin-Remodelling und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, was die Voraussetzung für die Aktivierung und Bereitstellung der Glucosetransporter in der Plasmamembran ist. Es wird angenommen, dass Phosphorylierungen von Proteinen, die der Strukturierung des Zytoskeletts dienen und direkte Interaktionen mit den aPKCs diesem Vorgang zu Grunde liegen (Patel et al. 2003).

Weitere Hinweise legen nahe, dass die aPKCs eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Zellpolarität besitzen. Ein spezifischer Knockdown der aPKC in *C. elegans* Embryonen zeigte eine fehlerhafte anterior-posterior Polarisation der Zygote (Tabuse et al. 1998). Zudem konnte in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden, dass aPKCs bei der Zell-Zell Adhäsion und der Ausbildung von *tight junctions* wichtig sind (Suzuki et al. 2001).

Die aPKCs sind außerdem an der hepatischen insulinabhängigen Lipidsynthese beteiligt. Durch das wichtigste anabole Hormon Insulin kommt es neben der Steigerung der Glycogenbildung zur Energiespeicherung und der Glycolyse, ebenfalls zu einer gesteigerten Bildung von Lipiden, den

Triacylglyceriden und dem Cholesterin. Der Insulinrezeptor gehört zu den Transmembranrezeptoren, deren transmembranär und intrazellulär gelegene β -Untereinheiten eine Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. Kommt es zu einer Bindung von Insulin an die beiden α -Untereinheiten extrazellulär, bedingt dies eine Konformationsänderung, wodurch die β -Untereinheiten aneinander gelagert werden und sich gegenseitig phosphorylieren und aktivieren. Dies führt zu einer weiteren Phosphorylierung von Untereinheiten des Rezeptors, die eine Bindung durch die IRS-Proteine begünstigen. Die IRS-Proteine stellen als Adaptorproteine ein Bindeglied der Signalkaskade des Insulinsignals auf intrazelluläre Enzyme wie die aPKCs dar (Farese et al. 2005). In Hepatozyten erfolgen die Aktivierungen der PI3-Kinase sowie der aPKCs durch eine Phosphorylierung des IRS-2 am intrazellulären Teil des Insulinrezeptorkomplexes. Es konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung der aPKCs die Expression des SRBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein*) gesteigert wird, welches wiederum eine erhöhte hepatische Lipidsynthese bewirkt (Matsumoto et al. 2003). Die Familie der *sterol regulatory element-binding Proteine* (SREBPs) regulieren viele Proteine auf Genebene, indem sie an das *sterol regulatory element* (SRE) der Promotorregion von bestimmten Zielgenen binden und die Induktion von Schlüsselenzymen fördern, welche die Cholesterinsynthese /-aufnahme sowie die Triacylglycerid- und Fettsäuresynthese regulieren.

Weiterhin gibt es Hinweise aus verschiedenen Studien darauf, dass es eine gewebespezifische insulinabhängige Aktivierung der aPKC in der Leber und im Muskelgewebe gibt, so ist die Aktivierung der aPKC in Hepatozyten initiiert durch eine IRS-2/PI3-Kinase, wohingegen in Myozyten die Aktivierung der aPKC maßgeblich durch IRS-1/PI3-Kinase erfolgt. In Tiermodellen (Goto-Kakizaki Ratten und ob/ob Mäuse) mit Bedingungen einer Insulinresistenz, die dem Zustand eines Diabetes mellitus ähneln, ließ sich zeigen, dass die Aktivierung der aPKC in Hepatozyten weiterhin intakt ist, wohingegen das Insulinsignal in Myozyten eine reduzierte aPKC-Aktivierung und somit einen verminderten Einbau der GLUT-4 Transporter nach sich zieht. Dies wird durch Experimente mit IRS-knockout Mäusen und IRS-2 defizienten Mäusen bestätigt (Sajan et al. 2006). Der gewebespezifische insulinabhängige Signalweg der aPKC (IRS-1 in Myozyten, IRS-2 in Hepatozyten) könnte erklären, weshalb es bei Bedingungen einer Insulinresistenz einerseits zu einer verminderten Aufnahme von Glucose in Muskelzellen und damit verbundener Hyperglykämie kommt und andererseits paradoxerweise in Hepatozyten weiterhin die Insulin-induzierte Cholesterin-/Lipidsynthese gesteigert ist, verbunden mit einer pathologischen Hyperlipidämie (Farese et al. 2005). Die genaue Ursache der weiterhin intakten IRS-2 vermittelten aPKC Aktivierung ist bis dato nicht geklärt. Dieser Zusammenhang legt nahe, dass die Aktivierung der aPKCs bei der Entwicklung bzw. der Pathogenese einer Insulinresistenz und damit verbundenen Risiken essentiell ist. Das genaue Verständnis der Pathophysiologie sollte daher weiter untersucht

werden, dies könnte eine weitere therapeutische bzw. präventive Strategie in Behandlung der Folgen einer Insulinresistenz, wie eine diabetogene Stoffwechsellage, Hyperlipidämie und Adipositas zu entwickeln, darstellen. Eine spezifische Hemmung der hepatischen aPKCs in dieser Konstellation stellt ein mögliches therapeutisches Ziel dar.

Ebenso gibt es mehrere Hinweise, dass der Signaltransduktionsweg der atypischen PKCs einen Einfluss auf die Aktivierung von NFκB und somit auf die Zellproliferation und den Zelltod haben (Lallena und Diaz Meco 1999). So zeigen PKC ζ- knockout Mäuse ein vermindertes NFκB Signal, wohingegen PKC λ-Knockout Mäuse in einem frühen Embryonenstadium versterben (Suzuki et al. 2003).

Die aPKCs sind in der Lage NFκB direkt durch Phosphorylierung zu aktivieren. Zudem verhindert die Phosphorylierung und Aktivierung der IκB-kinase (IKK-β) durch die aPKC den inhibierenden Effekt auf NFκB (Duran et al. 2003), wodurch ein Transport in den Nukleus und somit die NFκB –abhängige Genexpression von Zytokinen gefördert wird, die proinflammatorisch wirken und eine systemische Insulinresistenz sowie arteriosklerotische Prozesse begünstigen können (Cai et al. 2005).

Weiterhin scheinen die aPKCs an dem Wachstumsfaktor induzierten Signalweg der PI3-K und Ras beteiligt zu sein, die zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen Kaskade führt, welche für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung entscheidend sind (Bjorkoy et al. 1997).

Vorherige Untersuchungen zeigen eine direkte Ko-Lokalisation der aPKCζ/ι mit den Gallensalztransportern BSEP und MRP2 an der kanalikulären Membran (Stross et al. 2009). Die funktionelle Relevanz ist bisher nicht geklärt. BSEP-Transporter gehören zu den ABC-Transportern und dienen in Hepatozyten zur aktiven ATP-abhängigen Sekretion der Gallensäuren aus den Hepatozyten in die Canaliculi der Gallenwege entgegen des Konzentrationsgradienten. MRP2 gehört ebenfalls zu der Familie der ABC-Transporter, die als Gemeinsamkeit eine ATP-bindende Kassette besitzen und ATP-abhängig spezifische Substrate über eine Membran transportieren können. Das Hauptsubstrat von MRP2 ist konjugiertes Bilirubin.

Die genauere Funktion der PKCι in Hepatozyten ist bisher nicht geklärt. Diese Funktion sollte in diesem Projekt weiter untersucht werden. Um einen möglichen Einfluss auf die Genexpression verschiedener Proteine durch die aPKC zu analysieren, wurde in einem Vorversuch zu diesem Projekt der spezifische Inhibitor der aPKC, ein myristyliertes Pseudosubstrat (PS), eingesetzt und mittels eines DNA MicroArray ausgewertet (Gehrmann T, Häussinger D 2008). Dieses PS blockiert spezifisch die Substratbindungsstelle der atypischen Proteinkinasen, ähnlich wie das proteineigene PS und inaktiviert diese irreversibel.

Bei diesem Versuch wurden primäre Rattenhepatozyten (*Rattus norvegicus*) nach Isolation mit dem Pseudosubstrat inkubiert. Ergebnis dieses Versuchs war (u. a.) eine signifikante Hemmung der mRNA-

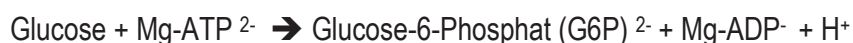
Expression der **Glucokinase** nach Zugabe des PS. Dies lässt eine genregulatorischen induktiven Einfluss der aPKCs auf die GK vermuten. Dieser Effekt sollte in diesem Projekt mit anderen Methoden validiert und weiter im Detail untersucht werden.

1.2. Glucokinase (GK)

Glucose ist der wichtigste Energieträger tierischer Zellen. Die Glucose-Homöostase im Blut spielt dabei eine wichtige Rolle, um Zellen ausreichend mit Glucose zu versorgen. Die Bereitstellung erfolgt entweder über die Nahrungsaufnahme, die Freisetzung von Glucose aus in der Leber gespeicherten Glycogen oder die Neubildung in der Leber (Gluconeogenese). Insbesondere das Gehirn und Erythrozyten sind auf diesen Brennstoff angewiesen. Durch die Verstoffwechslung dieses Moleküls, die Glycolyse, wird Energie in Form von Adenosintriphosphat für synthetische Reaktionen und zahlreiche Stoffwechselforgänge für die Zellen bereitgestellt. Hierbei erfolgt zunächst die Spaltung von Glucose in zwei Moleküle Pyruvat, welche unter aeroben Bedingungen mit Hilfe des Citrat-Zyklus und der Atmungskette unter ATP-Gewinnung in Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut werden. Die Speicherung des Energiebausteins Glucose, welche in Myozyten und Hepatozyten erfolgt, wird durch die Aneinanderkettung der einzelnen Monosaccharide zu dem Polymer Glycogen gewährleistet, sodass die kurzfristige Speicherung der Glucose sichergestellt werden kann.

1.2.1. Die besondere Kinetik der GK, der „Glucose-Sensor“

Die Glucokinase (GK, auch Hexokinase IV) ist ein wichtiges Enzym für die Regulation des Blutglucosespiegels. Sie kommt zum größten Teil in Hepatozyten (99%), aber auch in β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, endokrinen Zellen des Magen-Darm-Trakts und im Gehirn vor. Sie phosphoryliert Glucose an der C-6-Hydroxylgruppe. Sie ist auch in der Lage andere Hexosen wie Mannose und Fructose als Substrat zu phosphorylieren.



Diese ATP-abhängige Phosphorylierung ist eine Schlüsselreaktion für die verschiedenen Wege des Kohlenhydratstoffwechsels wie die Glycolyse, die Glycogensynthese und den Pentosephosphatweg. Hierdurch wird einerseits das Glucose-Molekül intrazellulär gehalten, da es phosphoryliert kein Substrat für die Glucosetransporter darstellt, andererseits erfolgt eine Stabilisierung der Glucose zur weiteren Verstoffwechslung. In Hepatozyten wird durch die Reaktion der GK die Bildung von Glycogen

gesteigert, in den β -Zellen des Pankreas führt die Phosphorylierung letztendlich zur Ausschüttung von Insulin ins Blut (physiologische Blutglucose-Schwelle = 5mM) und somit zur Senkung des Blutzuckerspiegels und der Verwertung von Glucose. Bemerkenswert ist dabei, dass die GK, im Gegensatz zu anderen Hexokinasen, eine geringere Affinität (K_m Wert = 5,5mM) zu ihrem Substrat besitzt, sodass sie nur bei entsprechend hohen Konzentrationen aktiv ist. Andere Hexokinasen, die ebenfalls Glucose zur G6P phosphorylieren (z.B. in Erythrozyten) besitzen einen niedrigen K_m -Wert ($K_m = 0,01\text{mM}$, $S_{0,5} \approx 5\text{mM}$) und sind schon bei geringsten Glucose-Konzentrationen aktiv, um eine kontinuierliche Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Zudem kommt es nach erfolgter Phosphorylierung nicht zu einer negativen Produkthemmung der GK durch das Produkt G6P. Weiterhin besteht zwischen Substrat und Enzym eine positive Kooperativität, d.h. nach Bindung des Liganden steigt die Affinität des Enzyms (Hill Koeffizient = 1,7) (Löffler 2014). Auf diese Weise werden einerseits bei niedrigen Blutglucosekonzentrationen zunächst die extrahepatischen Zellen mit Glucose versorgt und andererseits erfolgt bei hohen Konzentrationen eine schnelle hepatische Verwertung. Die Glucokinase hat im Bereich physiologischer Blutzuckerspiegel (2-10mM) eine hohe Affinität und reagiert auf geringste Schwankungen. Die essentielle Bedeutung der GK als „Glucosensensorysystem“ sowie bei der Glycogensynthese und Glucoseregulation wurde durch den spezifischen Knockdown der GK in Hepatozyten von Mäusen gezeigt, der mit einer dauerhaften Hyperglykämie einhergeht. Mäuse, bei denen die pankreatische GK ausgeknockt wird, sind nicht lebensfähig (Postic et al. 2001).

1.2.2. Aufbau der GK

Die GK ist ein monomeres Protein aus 465 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Es besteht eine 98% Identität zwischen der humanen Form und der Ratten GK. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Konformationszustände bzw. Proteinstrukturen die Bindung des Substrats an das Enzym beeinflussen bzw. dass durch die Bindung des Substrats eine Veränderung der Proteinstruktur (*closed form* mit hoher Affinität und *super open form* mit geringer Affinität, inaktiv) hervorgerufen werden. Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass die GK eine große und eine kleine globuläre Domäne enthält, die über einen flexiblen Hinge („Scharnier“) aus drei Loops verbunden sind. Zwischen den beiden Domänen befindet sich die Bindungsstelle der GK (Kamata et al. 2004). Die GK besitzt eine Substrat-Bindungsstelle und ist als Monomer katalytisch aktiv.

Das GK-Gen befindet sich auf Chromosom 7 mit insgesamt 10 Exonabschnitten. Dabei enthält das Gen zwei alternative Promoterregionen, die circa 30kbp aus genomischer DNA voneinander entfernt sind. Die beiden Promoter haben eine besondere gewebespezifische Funktionalität. So dient der *upstream* Promoter (auch neuroendokriner Promotor genannt), der Genexpressionsinduktion in nicht-hepatischen

Zellen, wie den β -Zellen des Pankreas, enteroendokrinen Zellen und speziellen Zellen im ZNS (Jetton et al. 1994). Der weiter *downstream* gelegene Promotor dient der Transkriptionsinitiation in Hepatozyten.

1.2.3.Regulation der Glucokinase

Das Enzym GK wird auf mehreren Ebenen reguliert, den wichtigsten Einfluss hat dabei die hormonelle reziproke Steuerung durch Insulin und Glucagon, die besonders auf Genexpressionsebene stattfindet und eine langfristige quantitative Regulation darstellt. Insulin induziert dosisabhängig die Genexpression des Enzyms und Glucagon inhibiert diese über den second Messenger cAMP (Ilyedjian et al. 2009). In Insulin-defizienten Zellen ist die GK-mRNA nicht nachweisbar, nach Gabe von Insulin kommt es zu einer erneuten Synthese der GK. In primären Rattenhepatozyten ließ sich eine 15 bis 30-fache Erhöhung auf mRNA-Level allein durch Insulin innerhalb von drei Stunden nachweisen (Ilyedjian 1993; Ilyedjian et al.1988).

Der genaue Signalweg der insulinabhängigen Stimulation der Expression ist bisher nicht eindeutig geklärt. Durch den Einsatz von Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-Kinase, kann die insulinabhängige Induktion der GK inhibiert werden, zudem ist der Effekt Proteinkinase B abhängig. Eine Regulation durch SREBP-1c wird kontrovers diskutiert (Hansmann et al. 2006; Gregori et al. 2005).

Außerdem wird der Insulineffekt durch den perivenösen Sauerstoffpartialdruck moduliert und durch Hypoxie stimuliert, übereinstimmend ist die GK überwiegend in den zentralvenösen Arealen und damit weniger aeroben Bereichen des Leberazinus lokalisiert. Hierbei scheint der Transkriptionsfaktor HIF-1 und das Hypoxia responsive Element (HRE) im hepatischen Promotor der GK eine Rolle zu spielen (Roth et al. 2004).

Das Angebot an Glucose beeinflusst ebenfalls die Expression der GK, so ist nach Fasten der Zellen keine mRNA der GK in Hepatozyten nachweisbar, dies ist nach erneuter Gabe von Glucose wieder aufgehoben und es kommt zu einem deutlichen Anstieg (Ilyedjian et al.1988).

1.2.4. Wechselwirkung mit dem GK-regulatorischen Protein (GKRP)

Die Aktivität der GK wird neben der transkriptionellen Regulation auch durch Veränderung ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen beeinflusst und reguliert. Hohe intrazelluläre Glucose-Konzentrationen bewirken in kurzer Zeit eine Translokation des Enzyms aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wohingegen die GK bei niedrigen Glucose-Spiegeln im Zellkern durch das Glucokinase-Regulatoryprotein (GKRP) inaktiv gebunden und konserviert wird (Agius 1998).

Von Schaffingen beschrieb erstmalig eine schnelle Regulierung der GK-Aktivität bei hohen Glucose-Spiegeln im Blut durch Bindung eines regulatorischen Proteins im Nukleus von Hepatozyten. Dieses regulatorische Protein besteht aus 626 AS und besitzt ein MG von 68kDa und ist zum größten Teil im Nukleus lokalisiert. Die Bindung des GGRP und der GK erfolgt durch eine Komplexbildung der beiden Proteine und stellt eine kompetitive Hemmung der Glucokinase dar (Von Schaffingen 2004). Untersuchungen an Mitochondrien in Hepatozyten belegen, dass sowohl die GK als auch das assoziierte regulatorische Protein GGRP ebenfalls in Mitochondrien lokalisiert sind. Die genaue Bedeutung dieser Lokalisation ist noch unklar (Arden et al. 2006). Ferner wird das regulatorische Protein auch in Neuronen des ZNS von Ratten exprimiert, in Gegenwart der GK, wobei die genaue Funktion ungeklärt ist (Alvarez et al. 2002).

Es wird angenommen, dass bei Bedingungen einer Hyperglykämie, der Einstrom von Glucose-Molekülen durch insulinunabhängige GLUT-2 Transporter entlang des Konzentrationsgradienten in die Hepatozyten eine Dissoziation der GK von seinem regulatorischen Protein bewirkt und es zu einem Export aus dem Nukleus vermittelt durch ein *nuclear export signal* (NES) (zwischen AS 300 und 310) in das Zytoplasma kommt. Sinkt die Glucose-Konzentration intrazellulär, kommt es zur Translokation der GK in den Zellkern und zur erneuten Bindung an das GGRP. Die genauen Mechanismen des Imports und des Exports sind bisher nicht geklärt. Da die GK nicht über ein klassisches *Nuclear localization signal* (NLS) verfügt, legt dies einen Transport durch ein anderes Protein nahe. Dies könnte ebenfalls durch das GGRP erfolgen (Shiota et al. 1999; Kaminski et al. 2014). Das GGRP ist zu einem geringen Teil, ohne Bindung an die GK, ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert.

Diese Regulation mittels Translokation findet maßgeblich in Leberzellen statt, wobei Sorbitol und Fructose-1-Phosphat (F-1-P) die Freisetzung der GK steigern. Sorbitol wird intrazellulär zu F-1-P umgewandelt und phosphoryliert, es ist bekannt, dass Sorbitol intrazellulär einen starken aktivierenden Effekt auf die Translokation hat. Zudem ist bekannt, dass Fructose-6-phosphat, die AMP-Kinase und AICAR einen inhibitorischen Einfluss auf die Translokation der GK besitzen. Dies erfolgt bei der AMPK a.e. durch eine Phosphorylierung des GGRP und der 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Ebenso kommt es durch Glucagon und Ethanol zu einer Hemmung der Translokation (Mukhtar et al. 2008). Die außergewöhnliche Regulation des Enzymsystems durch eine zusätzliche Bindung an ein regulatorisches Protein, das konzentrationsabhängig reagiert, verdeutlicht die essentielle Funktion dieses Enzyms im Glucosestoffwechsel.

1.2.5. Pathologie und therapeutische Möglichkeiten

Neben der Inaktivierung der GK durch das GKRK werden auch ein Schutz des Enzyms vor dem Abbau durch Proteasen und der intrazellulären Degradation sowie eine Konservierung der GK im Nukleus als Funktionen des GKRK angenommen. Das Fehlen bzw. die Inhibition des GKRK in Tiermodellen führt zu einer deutlich verminderten GK-Aktivität und insgesamt zu einer eingeschränkten Glucose-Toleranz (Fujimoto et al. 2004; Hiskett et al. 2009). Jedoch fiel in diesen Versuchen eine erhöhte Bildung der GK-mRNA auf, was eine genregulatorische Funktion bzw. eine translations- und posttranslationale Regulation durch das GKRK vermuten lässt (Grimbsy et al. 2000). Genetische Polymorphismen des GKRK (GCKR-Gen, Chromosom 2) sind nach neueren Studien mit einer Hypertriglyceridämie und der Entwicklung einer Leberfibrose bei Patienten mit einer *Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) vergesellschaftet, dies legt die wichtige physiologische Bedeutung des GKRK nahe (Petta et al, 2014; Lin et al, 2014). Brichard et al. konnten zeigen, dass eine anhaltend erhöhte Glucose-Konzentration entsprechend einer Insulinresistenz eine vermehrte Genexpression des GKRK, aber nicht der GK bewirkt, was zu einem Missverhältnis der beiden Proteine führt und zu einer verminderten Aktivität der GK („Glucose-toxizität“) (Brichard et al. 1993).

Eine verminderte Aktivität bzw. „loss of function“-Mutation im Gen der GK führt zu einer permanenten Hyperglykämie und wird ebenfalls bei verschiedenen Formen des Diabetes mellitus (MODY-2, PPH1) beobachtet und scheint eine wichtige Rolle in deren Pathophysiologie zu spielen (Miller et al. 1999).

Aufgrund der Tatsache, dass die GK eine essentielle Rolle im Glucose-Metabolismus spielt und Veränderungen der Eigenschaften der GK zu pathologischen diabetogenen Stoffwechsellagen führen können, stellt die Steigerung der Translokation ins Zytoplasma und somit die Aktivierung der GK durch neue Pharmaka (sogenannte Glucokinase-Aktivatoren [GKA]) eine mögliche und wichtige Therapiestrategie bei Diabetes mellitus Typ 2 neben den schon angewandten Therapieformen dar (Matschinsky et al. 2009). Die Entwicklung und Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beruht maßgeblich auf einer genetischen Störung, die eine große Anzahl von Genen betrifft, die durch den Lebensstil und insbesondere durch Ernährung und durch körperliche Bewegung beeinflusst wird (Le Roith et al. 2004; McCarthy und Froquel 2002). Hierbei kommt es zu einer Reduktion der pankreatischen Inselzellen und zu einer Insulinresistenz der insulinabhängigen Zellen, die letztendlich zu einer Unfähigkeit der β -Zellen den erhöhten Insulinbedarf zu decken führt. Ziel der GKAs ist das Signal des Insulins auf die Glucokinase zu verstärken und so dem erhöhten Insulinbedarf entgegen zu wirken. Bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich letztendlich um eine im frühen Lebensalter manifestierende genetisch bedingte autoimmune Erkrankung, bei der es zu einem akuten und nahezu vollständigen Verlust der β -Zellen des Pankreas und somit der GK in Pankreaszellen

kommt. Therapeutische Ansätze durch GKAs könnten beim Diabetes mellitus Typ1 jedoch in der gesteigerten Antwort der GK in anderen Geweben liegen.

Die Wirkung dieser Glucokinase Aktivatoren beruht auf der besonderen Proteinstruktur der GK und den mindestens zwei verschiedenen Formen (s.o.), welche die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat bestimmen. Die GKAs rufen eine Konformationsänderung des Enzyms zur hochaffinen Form durch eine direkte Bindung an eine allosterische Bindungsstelle der GK hervor, wodurch zum einen die Dissoziation vom GKRP in Hepatozyten und zum anderen eine Zunahme der Aktivität der GK in anderen Zellen begünstigt wird (Coghlan und Leighton 2008). Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Molekülen aus verschiedenen Substanzklassen, die eine GK-Aktivierung hervorrufen, untersucht.

Klinische Phase I Studien zeigen, dass es unter der Einnahme von GKAs (Piragliatin [RO4389620] mit 5mg, 10mg, 25mg) zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion des Blutzuckerspiegels kommt, sowohl der Nüchternblutzuckerwerte als auch postprandial (Bonadonna et al. 2010). Jedoch ist dieser Effekt nur von kurzer Dauer. Zudem zeigte eine Langzeitstudie signifikante Nebenwirkungen des GKA MK-0941, wie die Erhöhung der Inzidenz von Hypoglykämien (<70mg/dl), Triglyceridämien, Gewichtszunahme und Erhöhung des systolischen Blutdrucks, sodass diese Studie frühzeitig abgebrochen wurde (Meininger et al. 2011). GKAs steigern in gesunden und in diabetischen Tieren die Glucose-stimulierte Insulinausschüttung und Glycogensynthese und reduzieren die Gluconeogenese in der Leber (Coope et al. 2006). Eine häufige Nebenwirkung der GKAs ist wie erwähnt eine Hypoglykämie, die unbehandelt mitunter letal verlaufen kann. Diesbezüglich bleibt abzuwarten ob klinische Studien einen Langzeiterfolg der Behandlung durch GKAs zeigen. Eine Kombination bzw. synergistische Wirkung der GKAs mit anderen Antidiabetika (wie z.B. Sulfonylharnstoffe, DPP4-Inhibitoren, Metformin oder Insulin) scheint vielversprechend und ist Gegenstand aktueller Studien.

Die genauen Vorgänge und Einflüsse der Regulation der GK als eines der Schlüsselenzyme im Glucosestoffwechsel und deren Verständnis sind essentiell, um die Pathophysiologie bei Zuständen einer Dysregulation oder molekularen Defekten nachzuvollziehen. Wie bereits erwähnt sind Moleküle, welche die Translokation der GK aus dem Zellkern fördern Bestandteil aktueller Studien. Das detailliertere Verständnis physiologischer Einflussfaktoren auf die Translokationsvorgänge der GK würde zur Optimierung einer pharmakologischen Therapie beitragen. Im Hinblick auf die zunehmende Inzidenz und Morbidität/Mortalität von Krankheiten wie Adipositas, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und die Entstehung von Arteriosklerose verbunden mit einhergehenden kardiovaskulären Risiken, die vergesellschaftet sind mit einer gestörten Glucose-Homöostase und einer reduzierten Insulinresistenz, ist die Erforschung pathophysiologischer Vorgänge auf zellulärer Ebene essentiell. In diesem Zusammenhang spielen Untersuchungen der Schlüsselenzyme wie die GK eine wichtige Rolle.

1.2.6. Die Glucose-6-Phosphatase, der Gegenspieler der GK

Die Umkehrung der Phosphorylierung von Glucose wird durch die G-6-Pase katalysiert. Die Dephosphorylierung bzw. Hydrolyse der Esterbindung dient der Bereitstellung von Glucose für nicht-hepatische Zellen nach dem Abbau von Glycogen aus der Leber. Die beiden Enzyme haben somit eine entgegengesetzte Wirkungsweise und werden ebenfalls reziprok reguliert. Insulin führt hierbei zu einer deutlichen Inhibition der G-6-Pase-Expression. Die G-6-Pase wird hauptsächlich in Leber- und Nierenzellen gebildet und ist membranassoziiert im endoplasmatischen Retikulum. Die subzelluläre Lokalisation der G-6-Pase bedingt die Notwendigkeit von spezifischen Transportern und sogenannten Translokasen, die einen Transport des Substrats in Vesikeln bzw. ins ER ermöglicht (Van Schaftingen und Gerin 2002). Genmutationen der G-6-Pase und Defekte im Transportsystem sind maßgeblich beteiligt bei der Entstehung von Glycogenosen Typ Ia und Ib (Cori 1952, Narisawa et al. 1978).

1.3. Gallensäuren beeinflussen den Glucosstoffwechsel

Die aus den Hepatozyten sezernierte Galle ist physiologischerweise ein Gemisch aus unterschiedlich konzentrierten Gallensalzen und anderen Bestandteilen wie z.B. Bilirubin, Phospholipiden (wie Lecithin) und Cholesterin. Allen Gallensalzen gemeinsam ist, dass sie Cholesterin-Abkömmlinge sind und in Hepatozyten nach Hydroxylierung und oxidativen Vorgängen durch eine Bindung mit Taurin oder Glyzin konjugiert werden. Der größte Anteil an der Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit wird durch die primären Gallensäuren Cholsäure (36 - 38%) und Chenodesoxycholsäure (32 -34%) sowie die sekundäre Gallensäure Desoxycholsäure (26 - 28%) gebildet. Sekundär bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Gallensäure im Darm durch Bakterien dehydroxyliert wird (Desoxycholsäure und Lithocholsäure). Der Hauptanteil (95%) der sezernierten Gallensäuren wird nach Rückresorption im terminalen Ileum nach Durchlaufen des enterohepatischen Kreislaufs über das Pfortadersystem erneut in der Leber aufgenommen. In der Leber werden die Gallensalze über die basolaterale (sinusoidale) Membran über das *Natrium-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) aufgenommen und an der apikalen (canaliculären) Membran der Hepatozyten über Transporter wie BSEP oder MRP2 sezerniert. Jedes Molekül kann diesen Kreislauf zwischen 4 bis 12 mal pro Tag durchlaufen (Cohen 2003). Gallensalze liegen aufgrund des alkalischen pH-Werts in der Galle bedingt durch einen hohen Hydrogencarbonat-Anteil als an Natrium gebundene Anionen vor. Die Gallensalze werden vor allem postprandial durch hormonelle Reize wie Sekretin und Cholezystokinin durch Gallenblasenkontraktion verstärkt ins Duodenum ausgeschieden und dienen der Emulsion von Lipiden zur Lipolyse und der

Aufnahme lipophiler Moleküle über den Darm. Dabei spielt die amphiphile Eigenschaft der Gallensäuren eine entscheidende Rolle, da sie einen hydrophilen Teil mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen sowie einen hydrophoben Teil mit dem Steroidkern und Methylgruppen besitzen und auf diese Weise zur Bildung von Mizellen befähigt sind und so die enzymatische Spaltung von hydrophoben Molekülen möglich machen.

Nach aktuellem Kenntnisstand haben Gallensäuren neben der Emulsion und Resorption von Fetten und Fettsäuren im Darm auch eine wichtige Funktion als Signalmoleküle mit hormonähnlichen Funktionen im Stoffwechsel (Keitel et al. 2008). Interessanterweise spielen sie eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Glucose-Homöostase, insbesondere bei der Bildung von Glycogen aus Glucose. Es konnte gezeigt werden, dass konjugierte Gallensäuren wie Taurocholsäure (TCA) *in vitro* und *in vivo* zu einer Aktivierung der Glycogensynthase (GS) via PKB führen und auf diese Weise die Glycogenbildung stimulieren, deren erster Schritt die Phosphorylierung von Glucose durch die GK ist (Fang et al. 2007). Des Weiteren führen Gallensäuren zu einer Stimulation der intestinalen GLP-1 Produktion über TGR-5, einem wichtigen G-Protein gekoppelten Rezeptor der Gallensäuren (und Aktivierung der PKA), das wiederum eine Steigerung der Insulinsekretion aus dem Pankreas bewirkt (Li und Chiang 2012). FXR ist ein intrazellulärer Rezeptor der Gallensäuren, der verschiedene Wirkungen auf Genebene durch Bindung an die DNA im Nukleus vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass FXR ebenfalls in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird und die Glucoseaufnahme (GLUT-2) sowie Glucose-abhängige Insulinsekretion und Expression fördert (Renga et al. 2010). Zudem ist die Induktion der FXR-abhängigen Zielgene durch Gallensäuren abhängig von der Aktivierung der aPKC ζ durch Insulin (Zhou und Hylemon 2014).

1.4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen den Effekt des Pseudosubstrats der atypischen Proteinkinase C ζ auf die Expression der GK, welcher in einem vorherigen Versuch gezeigt worden war, mit spezifischeren Methoden zu validieren und eine genau Dosis- und zeitabhängige Wirkung nachzuweisen. Zur genaueren Bestimmung der Regulation auf Genexpressionsebene, sollte die Methode der *Realtime*-PCR angewandt werden.

Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang bzw. Einflüsse auf die Translokation der GK, als wichtigste kurzfristige Regulation, untersucht werden. Neben dem zu untersuchenden Effekt auf Genexpressionsebene der GK ist ein Einfluss auf die Translokation der GK durch die aPKCs möglich. Es ist bekannt, dass auch die aPKCs zwischen Nukleus und Zytoplasma translozieren können (Perander et al. 2001). Eine mögliche Regulation der Translokation durch aPKCs könnte

insulinabhängig funktionieren, dies sollte im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet werden. Die Einflüsse auf die Lokalisationänderung der GK wurden mit der Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht, da eine intrazelluläre Translokation auf diese Weise unmittelbar detektiert werden kann.

Um weitergehend zu überprüfen, ob Gallensäuren einen intrazellulären Effekt auf den Glucosstoffwechsel durch Einfluss auf die Translokation der Glucokinase besitzen, sollten entsprechende Versuche durchgeführt werden. Zur quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenzversuche sollte eine automatisierte Methode genutzt werden, die es möglich macht in kurzer Zeit Lokalisationsunterschiede in großem Durchlauf auszuwerten. Hierbei wurden die Fluoreszenzsignale im Zellkern und im Zytoplasma verglichen und kumulativ ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

7500 Realtime PCR System	Applied Biosystems
Laserscanning Mikroskop LSM 510 meta	ZEISS, Jena, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Sterile Werkbank Hera Cell	Heraus, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2. Verwendete Kit-Systeme

- RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland); nach Anweisung des Herstellers verwendet.
- Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland)
- Qia Shredder von Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.3. Chemikalien

Medien:

- Williams E Medium Biochrom (Berlin, Deutschland) mit folgenden Zusätzen: 5% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% L-Glutamin, 100nM Insulin, 100nM, Dexamethason in DMSO
- Glucosefreies Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von life technologies "No Glucose Medium" Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (Dulbecco), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4. Verwendete Antikörper

2.1.4.1. Primär-Antikörper

Antikörper/Epitop	AK-Spezies	Verdünnung	Katalog-Nr.
H-88 Glucokinase Anti: mouse, rat, human	rabbit	1:500 (5%FCS)	sc-7908
C-14 G-6-Pase Anti: mouse, rat, human	goat	1:500 (5%FCS)	sc-27198
H-300 GKRP Anti: mouse, rat, human	rabbit	1:500 (5%FCS)	sc-11416
H1 atypische PKC Anti: mouse, rat, human	mouse	1:500 (5%FCS)	Sc-17781

Tabelle 1 Primäre Antikörper (Hersteller Santa Cruz Biotechnology inc., Dallas, USA)

2.1.4.2. Sekundär-Antikörper und Fluoreszenz-Farbstoffe

Antikörper/Farbstoff	AK-Spezies	Farbe	Verdünnung	Ziel-Struktur/Protein
Cy3 anti-rabbit	mouse	Rot	1: 500 (5% FCS)	GK, GKRP
Fitc anti-goat	mouse	Grün	1:200 (5% FCS)	G6Pase
Fitc anti-mouse	goat	Grün	1: 200 (5% FCS)	aPKC
Hoechst 33342		Blau	1: 20000 (5% FCS)	DNA

Tabelle 2 Sekundäre Antikörper und Farbstoffe (Hersteller Jackson Immuno Research, Suffolk, England)

2.1.5. Isolierte Zellen

Bei allen Versuchen wurden primäre Zellkulturen von Hepatozyten aus Ratten (Spezies: Rattus norvegicus, männlich) unter Bedingungen einer sterilen Arbeitsbank benutzt. Primär bedeutet hierbei, dass es sich um Zellen handelt, die aus Organen durch Isolierung gewonnen werden und deren Lebensdauer unter in-vitro-Bedingungen begrenzt ist. Sie wurden im Labor der Experimentellen Hepatologie nach Standardverfahren hergestellt, wie unter 2.2.1. dargestellt. Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: AZ:9.93.2.10.43.07.021 22.1.2007 ; AZ: 8.87.51.05.20.10.085 21.3.2010 (Antragssteller: Prof. Dr. D. Graf)

2.1.6. Materialien für die PCR und qRT-PCR

d NTP mix

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq DNA Polymerase Roche, Mannheim, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur: Isolierung und Kultivierung von primären Hepatozyten

Für die Isolierung der Hepatozyten wurden die Ratten (spez. *Rattus norvegicus*) zunächst intraperitoneal anästhesiert (Rompun 5mg/kg KG, Ketavet 20mg/kg KG). Darauffolgend wurde den Tieren Heparin intravenös verabreicht und der Bauchraum mit einem Längsschnitt eröffnet. In Situ wurde die Pfortader kanüliert (16G), mit niedrigem Fluss perfundiert (Perfusionsmedium B) und die untere Vena cava zügig ligiert, sowie der Brustraum eröffnet und Entlastungsschnitte in Vorhof und Aorta gesetzt. Der Fluss der Perfusion wurde dann entsprechend dem Lebergewicht (4% KG des Versuchstieres) erhöht und eine Abflusskanüle in die obere Hohlvene platziert. Perfundiert wurde das Lebergewebe für insgesamt 17 Minuten, wobei nach 14 Minuten auf eine Collagenase/BSA-Lösung gewechselt wurde, mit der die Zellverbindungen aufgelöst wurden. Kurz vor dem Ende der Perfusion wurde damit begonnen, die Leber frei zu präparieren. Nach Abschluss der Perfusion wurde die gesamte Leber mit Organkapsel entnommen. Für die Weiterverarbeitung wurde das Organ in eine Kristallisierschale gelegt, die Kanüle aus der Pfortader entfernt und das leberfremde Gewebe abpräpariert. Um die Leberzellen aus der Kapsel zu lösen, wurde die Kapsel mit einer Kanüle eröffnet und die Zellen in Collagenaselösung ausgeschüttelt. Eine Grobfiltration erfolgte, indem das Gewebe vorsichtig durch Mullkompressen gedrückt wurde. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (500 U/min bei 4°C für 3min), der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in begastem KHP vollständig resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde danach wiederholt, wobei die Zellsuspension dann in Zentrifugengläser feinfltriert wurde (70µm). Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50µl der Zellsuspension mit 450µl Trypanblau gemischt und in eine Neubauer Kammer aufgetragen. Zur Kultivierung wurde die Zellsuspension auf Collagen-beschichteten Kulturschalen verteilt (Zielwert: 1×10^6 vitale Zellen in 2ml pro Well). Die Beschichtung erfolgte mit 5µl Collagenlösung pro Well (50mg Collagen Typ VII [Sigma C-88979] in 0,5M Essigsäure), welches Hilfe eine Cell Scrapers verteilt, getrocknet und mit UV-Licht (366nm) sterilisiert wurde. Nach Isolation der Zellen und Kultivierung konnten die Zellen nach erneutem Medienwechsel (nach zwei Stunden, Williams E Medium) nach vierundzwanzig Stunden Inkubation (Hera Cell 150, 37°C, 5%CO₂) verwendet werden.

<p>Perfusionsmedien</p> <p>A) 1 L Krebs-Henseleit Puffer KHP (50 ml Stammlösung*) + 6mM Glucose (1,08g/l)</p> <p>B) 1 L Ca²⁺ /Sulfat-freies Medium (50 ml Stammlösung**) + 6mM Glucose (1,08g/l)</p> <p>*2300mM NaCl; 500mM NaHCO₃; 118mM KCl 23,6mM MgCl₂ ·H₂O; 24,6mM NaH₂PO₄ H₂O; 24mM Na₂SO₄; 25mM CaCl₂·2H₂O</p> <p>** ohne Na₂SO₄ und CaCl₂</p>
<p>Collagenaselösung: 3g BSA, 40-50 mg Collagenase, 1,5 ml 10mM CaCl₂,</p> <p>50 ml Ca²⁺ /Sulfat-freies Medium (B)</p>
<p>Hepatozytenmedium (William´s Eagle Medium): 5% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin,</p> <p>1% L-Glutamin, 100nM Insulin, 100nM Dexamethason in DMSO</p>

Tabelle 3 Verwendete Medien für die Isolation und Kultivierung der Zellen

2.2.2. Quantitative *Realtime*-PCR (qRT-PCR)

Die Methode der quantitativen *Realtime*-PCR (qRT-PCR) dient zur Messung der mRNA-Expression. Die einzelnen Arbeitsschritte dieser Methode werden folgend beschrieben.

2.2.2.1. Medienwechsel und Inkubation

Nach erfolgter Isolation der Rattenhepatozyten wurde bei den Zellkulturen nach 2 Stunden ein vollständiger Medienwechsel mit Williams E Medium (mit o.g. Zusätzen; 2ml/ Well) durchgeführt. Danach wurden die Zellen für zwanzig Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem FCS- und Insulin-freien Medium für sechs Stunden zum Zweck der De-Stimulation inkubiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte für zwei Stunden die Stimulation mit Insulin bzw. dem Pseudosubstrat als zwei Variablen im Versuchsablauf. Nach Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und gemäß Protokoll zur RNA Extraktion geerntet und weiterverwendet.

2.2.2.2. RNA Isolation

Für die Isolation der RNA aus den behandelten Hepatozyten wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet und gemäß der Vorgabe des Herstellers in folgenden Schritten durchgeführt:

Nach Absaugen des Mediums wird den Zellen ein RLT- Puffer, versetzt mit β -Mercaptoethanol [10 μ l/ml] für die Denaturierung und Reduktion von Proteinen und zur Lysierung der Zellwände hinzugefügt. RLT- Puffer enthalten Guanidiniumthiocyanat, welches neben der Zellwandlyse außerdem effizient RNAsen inhibiert (Chomczynski et al. 1987). Die Zell-Lysate werden dann mit einem Schaber abgetragen und auf die QIA-Shredder-Säule zur Homogenisierung pipettiert und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) für 2 Minuten zentrifugiert, wobei der Durchfluss mit den lysierten Bestandteilen im *Collection Tube* behalten wird.

Als nächster Schritt folgt die Zugabe von Ethanol (70 %) als Lösungsmittel, um optimale Bindungsverhältnisse zu gewährleisten. Danach werden die Proben in die RNeasy mini Säulen pipettiert und erneut zentrifugiert (12000rpm, 15 Sek), wobei diesmal der durch Zentrifugation an die Membran gebundene Inhalt der Säule, die vollständige Menge RNA, behalten wird.

Folgend wird zur Waschung 700 μ l RW1-Puffer auf jede Säule pipettiert, der ebenfalls Ethanol und geringe Mengen an Guanidin Thiocyanit enthält, darauf folgt die Zentrifugation der Proben. Die Säulen werden danach in neue Reaktionsgefäße transferiert und zwei Mal RPE-Puffer zur Waschung hinzugegeben, wobei nach der ersten Zugabe des Puffers eine Zentrifugation folgt.

Zum Trocknen der Säulen werden die Proben anschließend zentrifugiert (2 Minuten). Im letzten Schritt wird RNase-freies Wasser (30 μ l) zur Elution auf die Säulen gegeben, diese werden drei Minuten stehen gelassen und zum Abschluss erneut zentrifugiert, um die gesamte RNA-Menge von der Säule zu eluieren.

Durch Verwendung des RNeasy Mini Kit ist es möglich alle RNA-Moleküle mit einer Größe von über zweihundert Nukleotiden zu isolieren. Dadurch werden die größeren mRNA-Moleküle von den kleineren RNA-Molekülen, die kleiner als 200 Nukleotide sind (5S-RNA, 8S-RNA, tRNA), getrennt.

2.2.2.3. Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die gewonnene RNA wurde im folgenden Verfahren in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt, da DNA im Vergleich zur RNA stabiler ist. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte (OD) der RNA Proben mittels Spektrometrie (Ultrospec 2100 pro, Firma Amersham) bei 260 nm gemessen. Als Reinheitsgrad wurden für eine reine RNA - Lösung Werte zwischen 1,8 - 2 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) verwendet. Daraufhin wurde nach der Messung jeweils 1 μ g RNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 15 μ l verdünnt und mit 2 μ l *genomic DNA (gDNA) wipeout buffer* versehen und für zwei Minuten bei

42°C zur Reaktion gebracht. Der *gDNA wipeout buffer* dient zur Elimination evtl. genomischer DNA. Im nächsten Schritt wurden jeweils 4µl RT-Puffer (von Qiagen), 1µl Primer Mix und 1µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und bei 42°C für 15 Minuten bzw. 95°C für 3 Minuten inkubiert. Die Negativ-Kontrolle der Reaktion erfolgte mit einer Probe ohne das Enzym Reverse Transkriptase.

2.2.2.4. Primerdesign und Primer-Kontrolle mittels PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden DNA-Abschnitte gezielt amplifiziert (vervielfältigt). Hierbei werden spezifische Primer genutzt. Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die durch eine Hydroxylgruppe an Ihrem 3'-OH Ende als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme (Polymerasen), wie z.B. der Taq-Polymerase, dienen. Die Auswahl der Primersequenz für die *quantitative real-time* PCR (qRT-PCR) ist ein entscheidender Schritt bei Verwendung dieser Methode. Die Primer werden so gewählt, dass sie aufgrund der eigenen Nukleotidfolge mit hoher Spezifität nur an die Target-Sequenz binden können. Auf diese Weise wird die selektive Vervielfältigung der Target-Sequenz sichergestellt. Die optimale Länge der Nukleotidsequenz der Primer besteht aus circa 20 Basenpaaren (Rychlik 1990).

Zur Detektion und Quantifizierung von mRNA wird diese zunächst mittels der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In der anschließenden PCR werden Primer eingesetzt, die möglichst Exon-Grenzen übergreifen, um die simultane Detektion genomischer DNA, bei der die Exons durch Introns getrennt sind, zu vermeiden.

Es wurde von den Proteinen, deren mRNA Expression untersucht werden sollte, die codierenden Genom-Sequenzen (CDS) aus Datenbanken ermittelt (z.B. www.ncbi.nlm.nih.gov/protein). Die hieraus abgeleiteten Primersequenzen wurden mit Hilfe des *Tools* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) auf Spezifität überprüft. Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Um die Spezifität der Primer nachzuweisen, wurde eine PCR mit anschließender Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese (2,5%) des PCR-Produktes durchgeführt.

Der Ablauf der PCR (im Anschluss an die Reverse Transkription) wird folgend beschrieben: Bei einer Temperatur von 94°C wird der Denaturierungsschnitt eingeleitet, bei dem die doppelsträngige cDNA zu Einzelsträngen aufgetrennt werden. Durch Abkühlung auf eine bestimmte Temperatur wird die Bindung der Primer an ihre spezifischen komplementären Genabschnitte an den Einzelsträngen ermöglicht (*Annealing*). Im Elongationsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, was dem Temperatur-Optimum der verwendeten Taq-Polymerase entspricht. Nun findet die Verlängerung der Primer statt, bis zur vollständigen Synthetisierung des festgelegten Abschnitts. Dieser neu gebildete Einzelstrang kann in

der Folge vervielfältigt werden. Durch eine zyklische Wiederholung des Vorganges wird unter optimalen Bedingungen eine exponentielle DNA-Amplifikation erreicht, d.h. bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Transkripte. Die Zugabe der einzelnen Reaktionsbestandteile (cDNA, Primer, 10-fach Puffer, dNTPs, DMSO, Taq-Polymerase, H₂O) erfolgte nach Vorgabe des Protokolls des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Mit dem Agarosegel wurden durch das Prinzip der Gelelektrophorese die amplifizierten Genabschnitte nach ihrer Größe aufgetrennt. Als molekularer Größenmarker wurde O'Range 20bp *DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Anfärbung und Beschweren der Proben wurde (6facher) *Orange Loading Dye Solution* (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Von einer spezifischen Bindung wurde ausgegangen, wenn ein singuläres PCR-Produkt mit der zu erwartenden Größe detektiert werden konnte. Zusätzlich wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente aus dem Gel mittels QIA quick *Gel Extraction Kit* (Qiagen) extrahiert und zur Überprüfung sequenziert.

	Forward	Reverse
GK	5'-ACAAGCTGCACCCGAGCT- 3'	5-GATTTTCGCAGTTTGTGTCAG-3'
GKRP	5'-GCCTGGTGAATGGGAGTTG-3'	5'- GGGTCAGTGGGTTGGATTTTC-3'
G6Pase	5'-GTCCCGGATCTACCTTGC-3'	5'-AGCCACAGCAATGCCTGA-3
GUS	5'-GGATCCACCTCGCATGTT- 3'	5'-TTCTCCAGGAGAGCTTGG-3'
HPRT	5'-TGCTCGAGATGTCATGAAGGA-3'	5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3'

Tabelle 4 Sequenzen der verwendeten Primer

2.2.2.5. Durchführung der *qRT-PCR*

Die Methode der *qRT-PCR* basiert auf der Verfielfältigungsmethode der PCR. Während der Verfielfältigung der cDNA interkaliert hierbei der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR-Green in doppelsträngige DNA, die Stärke des Fluoreszenz-Signals steigt dabei proportional mit der amplifizierten cDNA Menge. Die Verfielfältigung der cDNA erfolgt wie bei der PCR in sich mehrfach wiederholenden Zyklen. Entscheidend dabei ist die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt (*cycle of threshold* [C_T Wert]) und entspricht dem Zeitpunkt, bei dem die Amplifikation der cDNA exponentiell wird. Je mehr cDNA vorhanden ist und repliziert wird, desto weniger Zyklen sind bis zum Erreichen des C_T -Werts notwendig und desto niedriger ist der gemessene C_T -Wert für ein Target-Gen. Die ermittelten C_T -Werte werden in einem nächsten Schritt mit den C_T -Werten von *Housekeeping*-Genen in Relation gebracht. Folglich handelt es sich hierbei um eine relative

Quantifizierung. *Housekeeping*-Gene (wie z.B. Beta-Glucoronidase [GUS]) sind Gene, die konstitutiv exprimiert werden, d.h. unabhängig von äußeren Faktoren bzw. den im Experiment gewählten Versuchsbedingungen. Die quantitative Messung erfolgte durch die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001).

Die spezifischen Primer wurden aus einem Stock (10pmol) zum Verhältnis 1:10 verdünnt mit jeweils 22µl pro Primer (*forward* und *reverse*) für die zu untersuchenden Gene GK, G-6-Pase, GKRP und 176 µl H₂O und auf insgesamt 8 Reagenzgefäße (a 25,8µl) zur Herstellung der cDNA pipettiert. Als *Housekeeping* Gene wurden Beta-Glucoronidase (GUS) und Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Zur Fluoreszenzmarkierung der cDNA-Stränge wurde ein Master Mix mit SYBR-Green nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden jeweils im Dreifachansatz pipettiert, als Kontrolle wurden Reverse Transkriptase-negative Proben angewandt.

2.2.3. Immunfluoreszenzen

Die Fluoreszenz ist eines der wichtigsten Markierungsverfahren in der biologischen konfokalen Mikroskopie. Zelluläre Strukturen können auf verschiedene Weise spezifisch mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome oder Fluorophore genannt) markiert werden. Der Proteinnachweis mittels Immunfluoreszenzen dient im Folgenden zur Ermittlung der zellulären Lokalisation der GK und der Untersuchung von Einflüssen auf die Translokation des Proteins. Verwendet wurde eine indirekte immunhistochemische Nachweismethode, bei der ein mit einem Fluorochrom gekoppelter Sekundärantikörper an ein Protein-spezifisches Immunglobulin bindet.

2.2.3.1. Versuchsaufbau und Versuchsprotokoll

Zur genaueren Bestimmung der Abhängigkeit von intrazellulärer Glucose-Konzentration und Translokation der GK aus dem Zellkern ins Zytoplasma wurden zunächst Konzentrationsreihen zur Validierung der Methode und internen Kontrolle durchgeführt. Zudem sollte eine Dosisabhängigkeit der Translokation untersucht werden. Bei den Versuchsreihen wurden steigende Glucosekonzentrationen gewählt, beginnend bei einem Medium ohne Zusatz von Glucose (= No Glucose Medium, 0g/dl) als Ausgangskontrolle. Es wurden dann steigende Konzentrationen bis maximal 4,5g/l Glucose eingesetzt. Nach der Zellisolierung primärer Rattenhepatozyten wurden diese in 12 Well-Platten (Zelldichte ca 1x 10⁶ Zellen/ml) auf 16mm Deckgläschen (DG) ausgesät. Es folgte zunächst ein Medienwechsel mit Williams E Vollmedium nach zwei Stunden mit einer folgenden Inkubationszeit für 24 Stunden. Am

Folgetag wurde erneut ein Medienwechsel durchgeführt, um die Zellen zu de-stimulieren indem ein Medium ohne Zusatz von Glucose für sechs Stunden verwendet wurde. Die anschließende Stimulation der Zellen unter der jeweiligen Bedingung erfolgte für zwei Stunden.

Versuchsbedingungen : Glucose 0g/dl, 1g/dl, 4,5 g/dl: in jeweils 3 Ansätzen

± 100nM Insulin, ± 50µM GCDC, ± 50µM CDCA oder ± 500µM Sorbitol

2.2.3.2. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Am Ende der Stimulationszeit wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und gekühltes PBS (4°C) auf die DG pipettiert. Die Fixierung erfolgte mittels Methanol (-20°C) für 30 Sekunden. Danach erfolgte ein erneuter Waschvorgang mittels PBS. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde 5% FCS (in PBS) verwendet und für 30 Minuten auf die DG gegeben und danach entfernt. Die Bindung des Erstantikörpers erfolgte in einer Feuchtkammer mit dem jeweiligen Antikörper (40µl) nach einem Verdünnungsschema (1h, RT) wie in Tabelle 5 aufgelistet und anschließend mit PBS gewaschen. Als Feuchtkammer wurde eine Schale mit Aqua dest getränktem Filterpapier genutzt. Als Sekundärintikörper wurden Immunglobuline mit konjugierten Fluorochromen benutzt (s. Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte in einem dunklen Raum bei RT für eine Stunde und anschließendem Waschen mit PBS und H₂O.

Die Objektträger wurden im Anschluss mit Ethanol gesäubert und es wurde ein Tropfen des Mounting Medium auf jedes DS gegeben. Die Fixierung der DG auf den Objektträger wurde mit handelsüblichem Nagellack durchgeführt und die Proben im Anschluss im Kühlraum 24 Stunden (4°C) gelagert.

Verdünnung 1:50					
1) GK	rabbit	5µl	+	aPKC H1 mouse 2,5µl (1:100)	} auf 250µl 5%FCS
2) GKRP	rabbit	5µl	+	aPKC H1 mouse 2,5µl	
3) G-6-Pase	goat	5µl	+	PDI mouse 1,66µl (1:150)	

Tabelle 5 Verdünnungsschemata der Primärintikörper. Die Primärintikörper für GK, GKRP und G-6-Pase wurden in einer 1:50 Verdünnung in 5% FCS verwendet und in den jeweiligen Ansätzen zusammen mit den Antikörpern für die atypische Proteinkinase C (aPKC) bzw. Proteindisulfid-Isomerase im Endoplasmatischen Retikulum (PDI) versetzt.

2.2.3.3. Auswertung und Analyse der Immunfluoreszenzen

Mikroskopiert wurde mit einem konfokalen *Laserscanning* Mikroskop (LSM510, Zeiss). Die entscheidende Besonderheit eines konfokalen LSM gegenüber einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ist eine konfokale Blende (*Pinhole*), durch die Streulicht von oben oder unterhalb

einer optischen Ebene blockiert wird. Der Durchmesser der Blende ist variabel und im Idealfall unendlich klein (punktförmige Detektion). Mit einem konfokalen LSM ist es möglich, aus einer dicken Probe (typisch bis 100 µm) ausschließlich eine dünne Präparatschicht, einen sogenannten optischen Schnitt, abzubilden, der bei entsprechenden Aufnahmebedingungen eine z-Ausdehnung von weniger als 500 nm aufweisen kann.

Der grundsätzliche Vorteil liegt somit in der Dünne der abgebildeten Bildschnitte, da bei konventionellen Mikroskopen „dickere“ Präparate unscharf abgebildet werden. Des Weiteren kommt es bei simultaner Beobachtung von Mehrfachfärbungen zur farblichen Vermischung der Bildinformationen aus den beteiligten Kanälen. Weiterhin tastet ein konfokales LSM die Objektoberfläche punktweise ab. Das heißt, das Bild entsteht nicht für alle Objektorte gleichzeitig (parallel), sondern nacheinander (seriell). Die erreichbare Auflösung wird entsprechend durch die Zahl der Abtastpunkte pro aufzulösende Struktur beeinflusst. Nach Anfertigung der Immunfluoreszenzbilder wurden in den ersten Versuchen zur Bewertung der Lokalisationsänderungen der GK, die Verteilung der Fluoreszenzsignale für die einzelnen Objektträger manuell ausgezählt. Das bedeutet, es wurde eine definierte Anzahl an Gesichtsfeldern bzw. Zellen ausgewählt und die Verteilung der Proteinlokalisierung der GK bestimmt und für die verschiedenen Bedingungen verglichen. Unterschieden wurde dabei lediglich, ob sich die GK mehr im Zellkern oder im Zytoplasma befindet. Um diesen Vorgang zu beschleunigen und eine objektive Methode zu nutzen wurde die automatisierte Analyse zur Detektion subzellulärer Proteinlokalisierungen etabliert. Hierbei wurde mit Hilfe der Software Zeta Batch UKD Configuration Manager beta V 1.0, entwickelt durch das Fraunhofer Institut für Informationstechnologie (FIT), der Quotient aus mittlerer Intensität der Fluoreszenz in Graustufen in dem Zellkern und dem Zytoplasma erstellt (Folgend auch „ I_{ZK} / I_{Cyt} “ *Value* genannt).

$$X = \frac{\text{average fluorescence intensity nucleus } (I_{ZK})}{\text{average fluorescence intensity cytoplasm } (I_{Cyt})}$$

Zur Evaluierung der Signifikanz von verschiedenen erarbeiteten Zahlenreihen wurde zur Errechnung eines Konfidenzintervalls der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test genutzt.

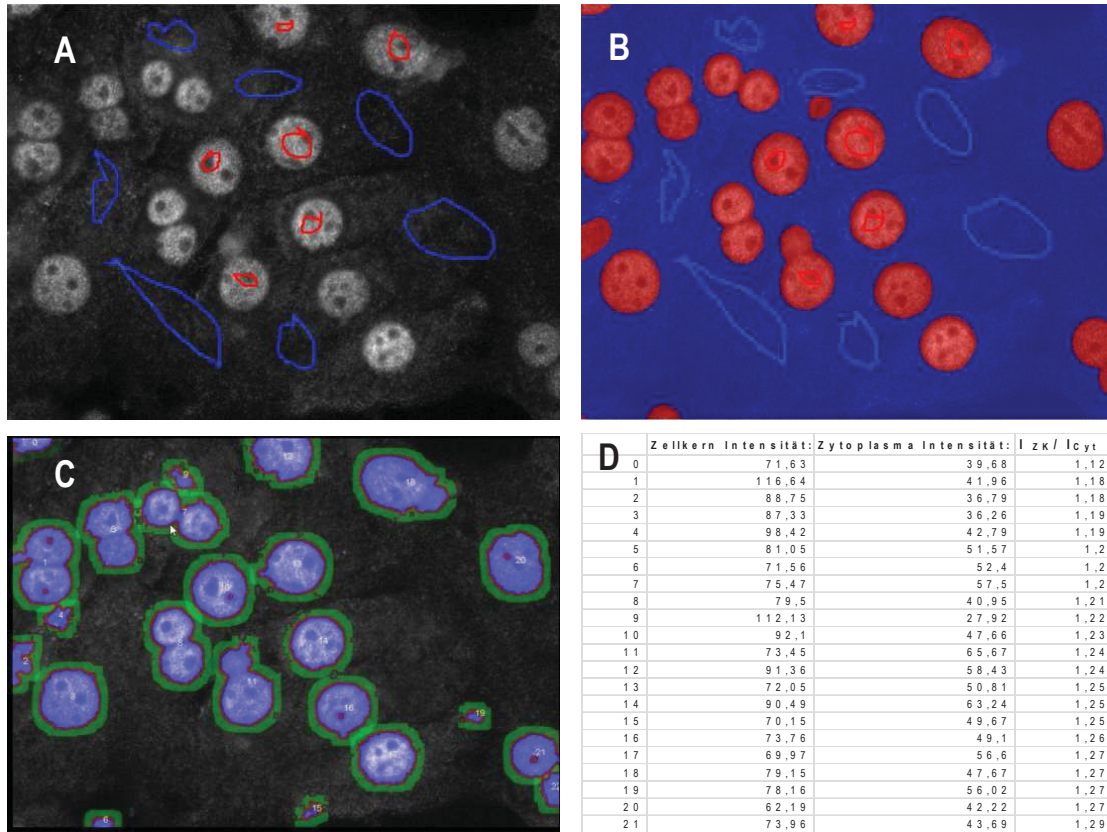


Abbildung 2 Auswertungsbeispiel mit Hilfe Zeta Batch UKD Configuration Manager beta V 1.0. A = Vorgabe von Vordergrund (rot, Zellkern) und Hintergrund (blau, Zytoplasma) zum Erstellen des Auswertungsalgorithmus. B = Mit Hilfe der vorgegeben Parameter aus A erfolgt die Bestimmung von Zellkern und Cytoplasma. C+D = Messung der Intensitäten für Zellkern und Zytoplasma und Errechnung des Intensitätsquotienten

3. Ergebnisse

3.1. DNA Microarray, Inhibition der GK-Expression durch myristolisiertes Pseudosubstrat

In einem Vorversuch wurden primäre Rattenhepatozyten mit oder ohne Pseudosubstrat (myristolisiertes Pseudosubstrat 25µmol für 2 Stunden) der atypischen PCKs inkubiert, um die Regulation von möglichen Zielgenen der aPKC mittels DNA-*Microarray* zu identifizieren (adaptiert von T. Gehrman und D. Häussinger, 2008). Nach der Inkubation wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und in die komplementäre cDNA transkribiert. Diese wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* markiert und zu dem *Microarray*-Chip hinzugegeben, auf dem sich einzelsträngige, fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenzen von verschiedenen möglichen Zielgenen der aPKC befanden. Die komplementären Sequenzen binden und hybridisieren, wobei das Ausmaß der Bindungen das Interkalieren des Farbstoffes beeinflusst, sodass es zu einem unterschiedlich starken Fluoreszenzsignal kommt. Die Unterschiede des Fluoreszenzsignals in Relation zur Kontrolle geben Aufschluss über die Expressionsrate eines einzelnen Gens (Stoughton 2005).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in diesem Versuch bei der Expression der Glucokinase. Festzustellen war eine signifikante Hemmung der Genexpression dieses Gens in Anwesenheit des Pseudosubstrats, sodass ein induktiver Einfluss der atypischen Proteinkinase C auf die Synthese dieses wichtigen Enzyms zu diskutieren war. Voraussetzung ist hierbei, dass die aPKC unter den gewählten Versuchsbedingungen aktiv ist. Zur Analyse wurde eine logarithmisch aufgetragene Ratio verwendet, bei der die Expression mit Inkubation des Pseudosubstrats zu der Expression der Kontrollbedingung verglichen wurde. Die Auswertung des Versuchs zeigte eine mediane Ratio von $-0,74$. Da es sich um eine logarithmische Funktion zur Basis 2 handelt, ergibt dies eine Reduktion der Expression auf circa 60% bei Inkubation mit dem Pseudosubstrat im Vergleich zur Kontrolle ($2^{-0,74} = 0,599$). Ratio-Werte ab $<-0,3$ wurden als *downregulation* gewertet (adaptiert nach Schäfer et al. 2007), d.h. eine Reduktion von mehr als 20 % wurde als signifikant angesehen ($2^{-0,3} = 0,81$).

Um dieses Ergebnis in der Folge zu validieren und weiter zu untersuchen wurden Experimente mit der Methode der quantitativen *Realtime* PCR durchgeführt. Ziel hierbei sollte die Analyse von Dosis-/Zeitverläufen der Hemmung der aPKC in Bezug auf die Genexpression der GK sein.

3.2. Quantitative *Realtime*-PCR

3.2.1. Versuchsvorbereitungen

Zur genaueren Analyse des Einflusses des Pseudosubstrats und der damit verbundenen Hemmung der atypischen Proteinkinase C λ 1 wurden Versuchsreihen mit der Methode der quantitativen *Realtime* PCR durchgeführt. Neben der GK als Zielgen wurden ebenfalls andere Gene ausgewählt, die in direktem Zusammenhang mit der Aktivität der GK stehen.

Nach Findung, Validierung und Fertigstellung der spezifischen Primer der Zielgene (GK, G-6-Pase, GKRP, GUS, HPRT, s. Material und Methoden), wurde den isolierten Hepatozyten das aPKC-Pseudosubstrat für zwei Stunden hinzugefügt. Danach folgten die RNA-Isolation und die reverse Transkription mit dem Ziel der Umwandlung der mRNA in cDNA. Die Kontrolle der reversen Transkription erfolgte durch Verwendung einer Reverse-Transkriptase-negativen Probe.

Als Fluoreszenzsignal zur Messung der cDNA in der exponentiellen Phase der PCR wurde der SYBR-Green Master-Mix verwendet. Entscheidend dabei ist die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal im linearen Bereich der Amplifikation befindet und einen Schwellenwert (=C_T Wert) überschreitet.

Die Veränderung der mRNA-Synthese wird bei der Auswertung in Relation zum Housekeeping Gen gesetzt (hier GUS, HPRT). Aufgrund deutlicher Schwankungen in den ersten Versuchsreihen wurden zur Stabilisierung der Versuchsbedingungen die Zellen vor Stimulation mit dem Agens in einen unstimulierten Zustand gebracht. Dieser wurde mittels Medienwechsel mit einem Medium ohne Glucose, FCS und Insulin für sechs Stunden vor Stimulation erzielt. Durch den Entzug z.B. von FCS kann der Zellzyklus der Zellen synchronisiert werden und die Zellen gehen in die G0-Phase über, nach erneuter Stimulation ist dieser Vorgang reversibel. Unter der Annahme, dass ein möglicher Einfluss der aPKC auf die GK insulinabhängig erfolgt, wurde als zusätzlicher Parameter die Wirkung durch die Hinzunahme / das Fehlen von Insulin auf die Genexpression gewählt.

3.2.2. Die mRNA Synthese der GK wird nicht durch die Gabe des Pseudosubstrats gehemmt; Steigerung der mRNA-Expression der GK und Repression der Glucose-6-Phosphatase-Expression durch Insulin

Als eine Methode den Effekt von Insulin auf isolierte Zellen zu untersuchen, wird ein initialer Entzug des Insulins, FCS und der Glucose für eine bestimmte Zeitdauer (hier sechs Stunden) angesehen. Durch die darauffolgende Hinzugabe von Insulin (100nM für 2 Stunden) ließ sich ein Effekt des Insulins auf die Genexpression der GK im Sinne einer Steigerung der mRNA-Bildung erzielen. Wie in den Abbildungen 3 bis 6 gezeigt ergibt sich aus der Berechnung des ΔC_T eine 9 bis 10-fache Steigerung der mRNA-Synthese der GK durch die Stimulation mit Insulin, zudem ließ sich eine reziproke Hemmung der G-6-Pase nachweisen in Relation zum *Housekeeping* Gen GUS. Der zusätzliche Einsatz des aPKC-Pseudosubstrats (PS) erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Synthese bei beiden Zielgenen.

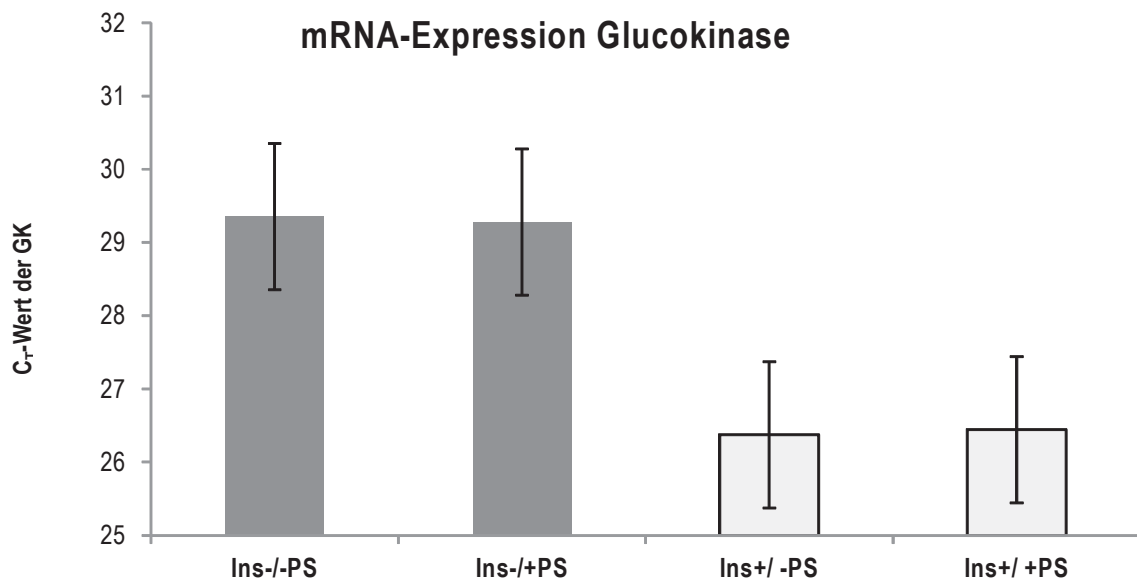


Abbildung 3 C_T-Werte der GK nach Stimulation mit Insulin (Ins +, [100nM]) bzw. dem Pseudosubstrat (+PS [25μM]) für zwei Stunden. Die Stimulation mit Insulin bewirkt eine Senkung der C_T-Werte im Sinne einer Steigerung der mRNA-Synthese. ΔC_T -Wert = 2,98 (C_T [Ins-/-PS] – C_T [Ins+/-PS]), dies entspricht einer mRNA-Steigerung um ca. das 10-fache (2^{2,98}). Das PS hat keinen signifikanten Effekt auf diese Expressionssteigerung und bewirkt auch in Abwesenheit von Insulin keine signifikante Veränderung der mRNA-Synthese

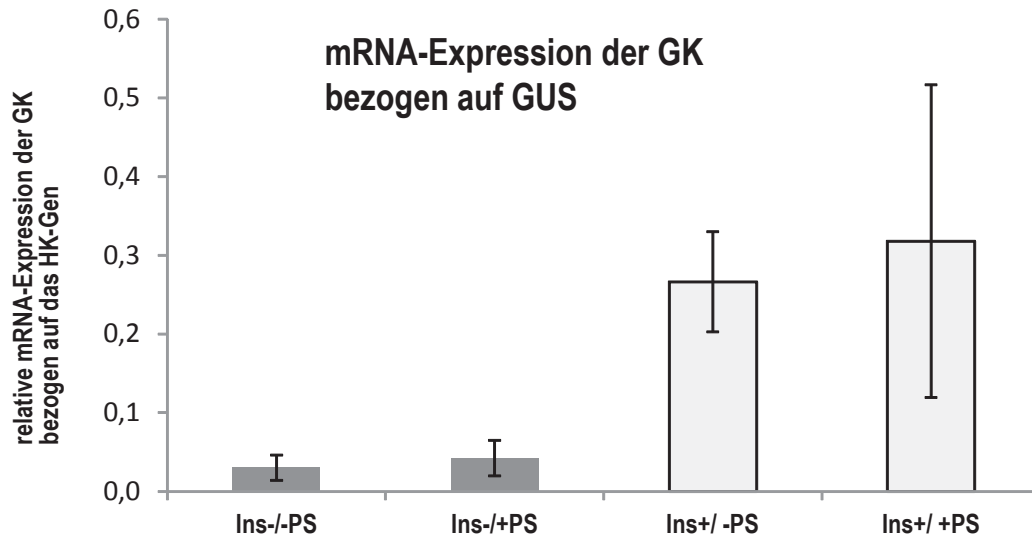


Abbildung 4 Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin in An- oder Abwesenheit des PS nach Normalisierung in Bezug auf das *Housekeeping-Gen* GUS. Es lässt sich kein Einfluss des PS auf die Expression der GK nachvollziehen, wohingegen Insulin eine Steigerung der mRNA-Expression bedingt. Die Y-Achse zeigt die relative Veränderung der mRNA-Expression gegenüber der Expression des Housekeeping-Gens.

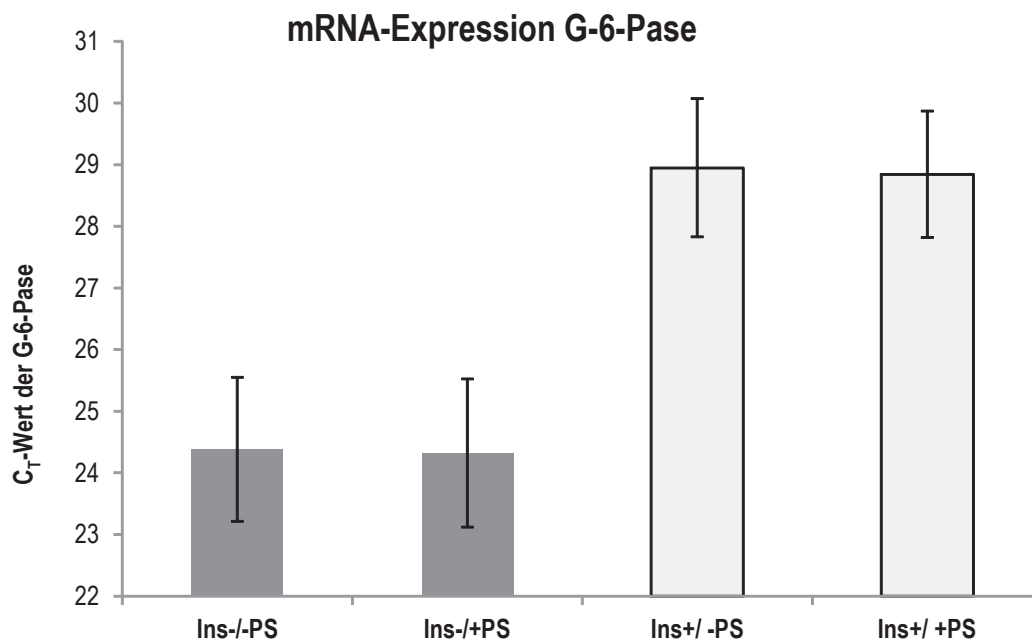


Abbildung 5 Repression der mRNA-Synthese der G-6-Pase durch Insulin (100nM). Die Erhöhung des C_T-Werts (ΔC_T [Ins+/-PS – Ins-/-PS] = 4,57) spiegelt die Reduktion der mRNA durch die Behandlung mit Insulin wieder. Ein Einfluss durch den Einsatz von PS auf den C_T-Wert der G-6-Pase zeigt sich nicht.

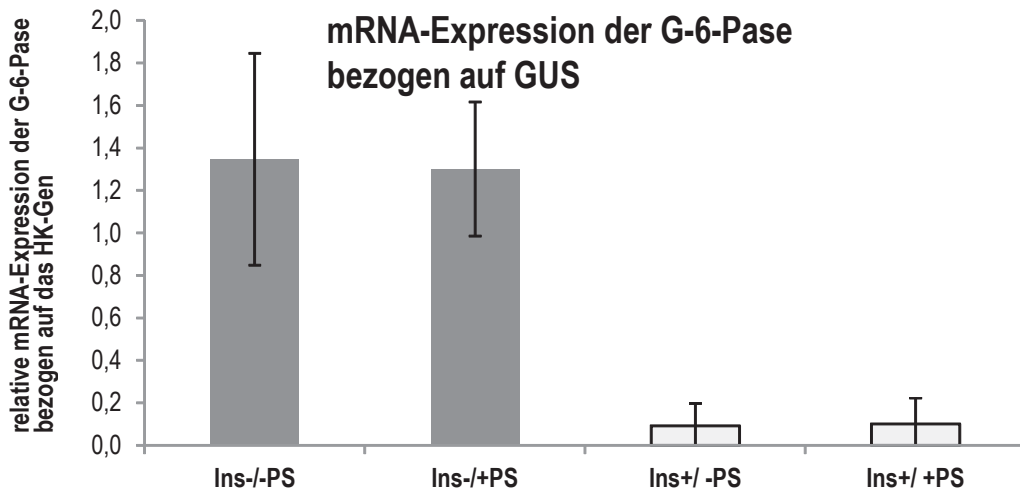


Abbildung 6 Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin in An- oder Abwesenheit des PS nach Normalisierung der G-6-Pase in Bezug auf das *Housekeeping-Gen* GUS. Die reziproke Beeinflussung der GK und G-6-Pase wird verdeutlicht, Insulin bewirkt eine Reduktion der Expression der G-6-Pase.

3.2.3. Die mRNA-Expression GKRP wird nicht durch Insulin beeinflusst

Neben dem Einfluss von Insulin auf die Expression der GK und G-6-Pase wurde untersucht, ob eine Veränderung der Expression des GKRP Proteins durch Insulin vorliegt. Nach Stimulation mit Insulin blieb die mRNA-Expression des GKRP wie in Abbildung 7 und 8 gezeigt konstant.

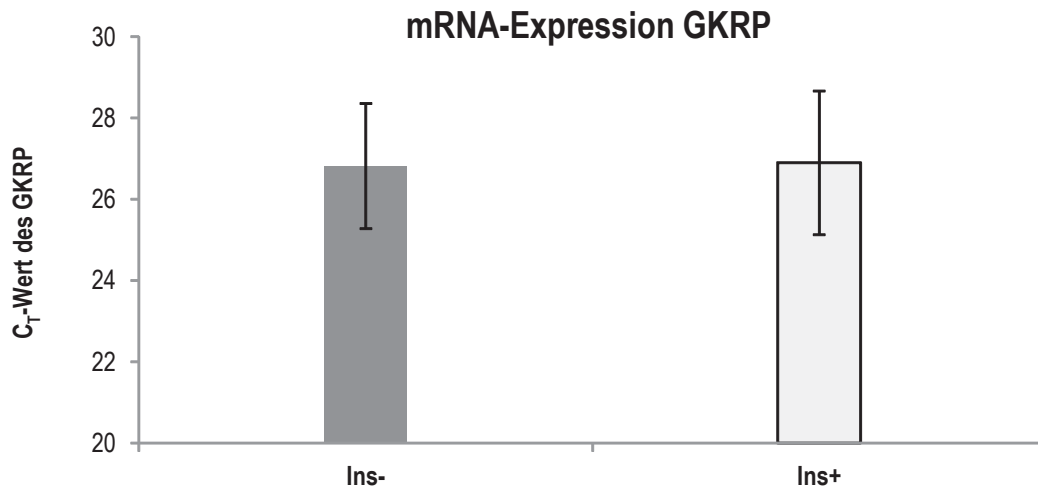


Abbildung 7 Analyse der C_T-Werte für GKRP nach Stimulation mit Insulin. Nach Stimulation mit Insulin zeigt sich keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression des GKRP.

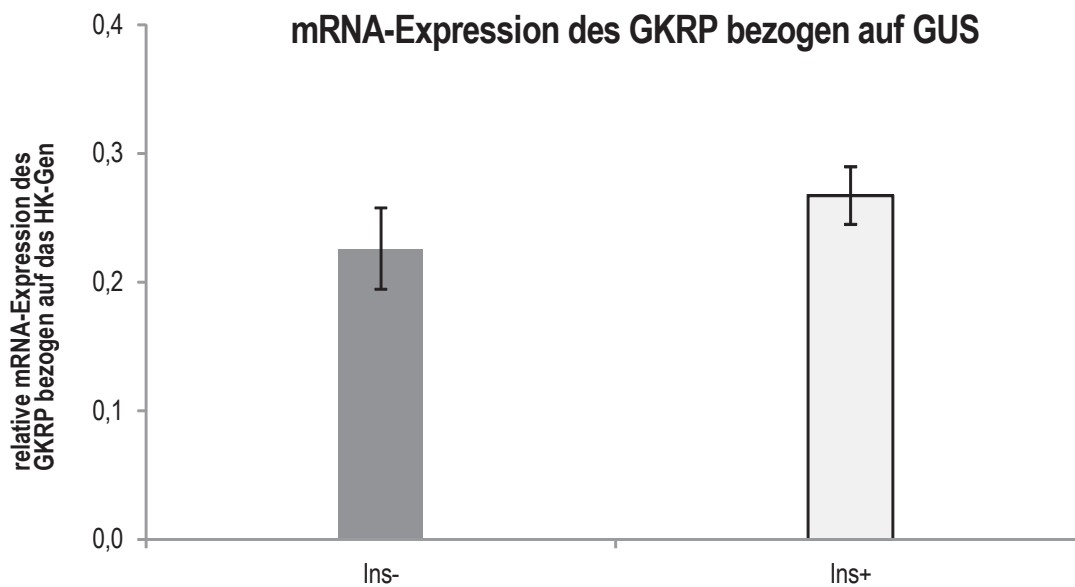


Abbildung 8 Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Insulin nach Normalisierung des GKRP in Bezug auf das *Housekeeping-Gen* GUS. Nach Korrelation auf das Housekeeping-Gen zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Insulin auf die Expression der GKRP.

3.3. Immunfluoreszenzen

Die Änderung der Lokalisation der GK ist ein wichtiger Bestandteil der Regulation des Enzyms. Wie in der Einleitung geschildert spielt die Translokation der GK eine große Rolle in der Aktivierung bzw. Regulation des Enzyms und somit auch bei der Verstoffwechslung des Substrats Glucose. Zur genaueren Darstellung und zur Untersuchung der Einflüsse der Translokation der GK wurden Versuche mittels Immunfluoreszenzen durchgeführt. Hierbei wurden neben dem Einfluss steigender Glucosekonzentrationen ebenfalls andere Moleküle untersucht, die eine Veränderung der Kinetik der Translokation bedingen. So führt Sorbitol nach intrazellulärer Umwandlung durch Oxidierung und Phosphorylierung zu Fructose-1-Phosphat zu einer gesteigerten Translokation der GK aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Die Methode der Immunfluoreszenz ist eine weitverbreitete und gut etablierte Technik, um subzelluläre Strukturen zu visualisieren und Vorgänge eines Lokalisationswechsels zu beobachten.

3.3.1. Glucoseabhängige Translokation der GK, ein Dosis-abhängiger Effekt

Die Translokation der GK wurde in einer Konzentrationsreihe mit verschiedenen Glucosekonzentrationen analysiert, um einen Dosis-abhängigen Effekt nachzuweisen und um das System zur Analyse subzellulärer Verteilungen von Proteinen zu validieren. Die GK befindet sich bei fehlender bzw. niedriger Glucose-Konzentration intrazellulär im Zellkern gebunden. Die konzentrationsabhängige Translokation wurde in verschiedenen Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. In der Arbeit von Wolff et al. wurden beispielweise Konzentrationen von 2,8mM, 8,4mM und 16,8 mM Glucose verwendet nach 12-stündigem Entzug der Glucose (entsprechend einer Konzentration von 0,5g/l, 1,51g/l und 3,03g/l, nach der Umrechnungsformel: $X \text{ mM} \times 18,0182 = X \text{ mg/dl}$) (Wolff et al. 2008). In den eigenen Untersuchungen wurden drei feste Konzentrationen ausgewählt, beginnend mit 0g/l Glucose, 1g/l Glucose bis 4,5g/l (entsprechend 5,55mM bis 24,98mM), wobei eine Konzentration von 4,5g/l, die in herkömmlichen Zellkulturmedien verwendet wird, was unter in vivo Bedingungen einer erhöhten („High Glucose“) Glucose-Konzentration entspricht. Eine Konzentration von 5mM (ca. 1g/l) entspricht der Schwellendosis, bei der die Aktivierung der GK in β -Zellen des Pankreas zu einer Insulinausschüttung führt. Wie Abbildung 9 dargestellt führt eine steigende Glucose-Konzentration dosisabhängig zur Translokation der GK aus dem Zellkern in das Zytoplasma.

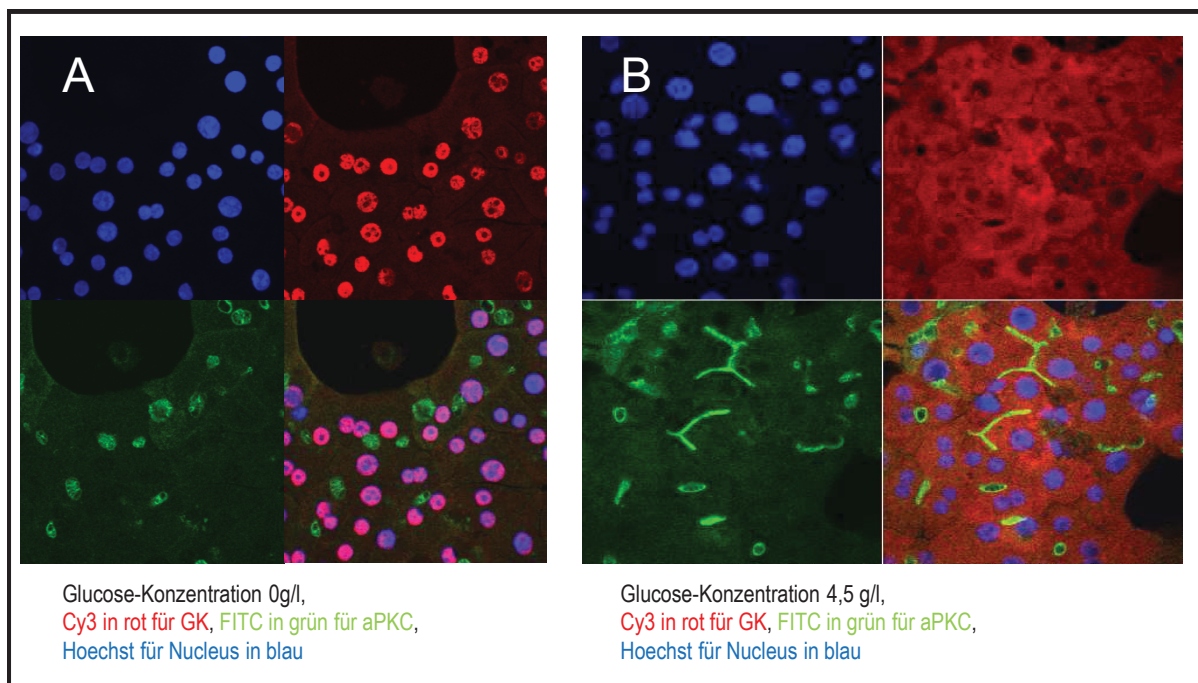


Abbildung 9 Eine steigende Glucosekonzentration im Medium bedingt die Translokation der GK aus dem Zellkern in das Zytoplasma. In Abhängigkeit der Glucosekonzentration zeigt sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Veränderung der Lokalisation der GK aus dem Zellkern (bei niedrigen Glucosekonzentrationen A links mit 0g/dl Glucose) in das Zytoplasma (rechte Bildhälfte B bei 4,5g/dl). Die aPKC ist in kultivierten Zellen kolokalisiert an der kanalikulären Membran.

3.3.2. Sorbitol aktiviert die Translokation der GK aus dem Zellkern ins Zytoplasma

Sorbitol gehört zu der Gruppe der sogenannten Alditole und ist die reduzierte Form der Glucose. Sorbitol zählt zu den Aktivatoren der Translokation der GK ins Zytoplasma und der damit verbundenen Aktivierung des Enzyms zur Phosphorylierung des Substrats. Der Effekt der gesteigerten Translokation durch Sorbitol in Anwesenheit von Glucose diente im Folgenden als interne Kontrolle der Versuchsreihen. Als Standarddosis wurde eine Konzentration von 500µM Sorbitol gewählt.

Es konnte gezeigt werden (Abbildung 10), dass Sorbitol allein einen Effekt auf die Translokation der GK aus dem Zellkern besitzt, der bei zusätzlicher Stimulation mit Glucose gesteigert wird. Ab einer Glucose Konzentration zwischen 2g/l und 3g/l mit 500µM Sorbitol ist die Translokationsrate nicht weiter zu steigern.

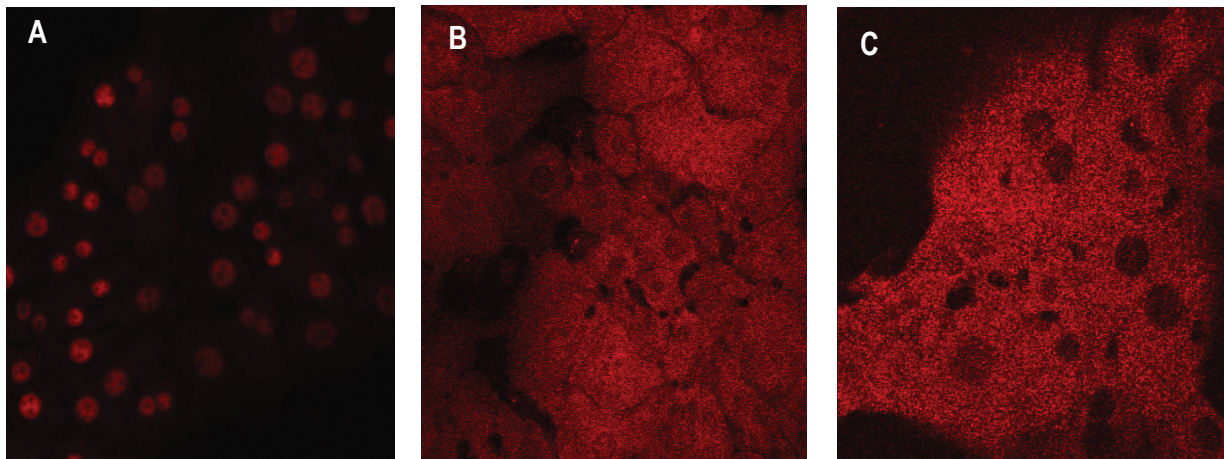


Abbildung 10 Immunfärbung der Glucokinase in primären Ratten-Hepatozyten nach Inkubation der Zellen mit 0g/l (A), 4,5g/l Glucose (B) oder 4,5g/l Glucose und 500 µM Sorbitol (C).

3.3.3. Automatisierte Bildauswertung zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen

Um die Translokation bzw. Lokalisation subzellulärer Strukturen weiter zu untersuchen, wurde die Methode der automatisierten Analyse mittels einer spezifischen Software (Zeta Batch UKD Configuration Manager V 1.0) verwendet, die eigens vom Fraunhofer Institut für Informationstechnologie (Professor T. Berlage und Mitarbeiter, FIT, Sankt Augustin, Deutschland) entwickelt wurde. Hierbei kann mit Hilfe der Software die Intensität des Signals im Zellkern in Korrelation zu der Intensität im Zytoplasma, hier in einem Saum von 0,5µm um den Zellkern, gemessen werden. Daraus wird für jede einzelne Zelle der Quotient aus der GK-gebundenen Fluoreszenzintensität im Zellkern und im Zytoplasma berechnet. Die so ermittelten Quotienten werden statistisch ausgewertet, um einen direkten Vergleich unter verschiedenen Versuchsbedingungen eines Versuchsablaufes zu ermöglichen.

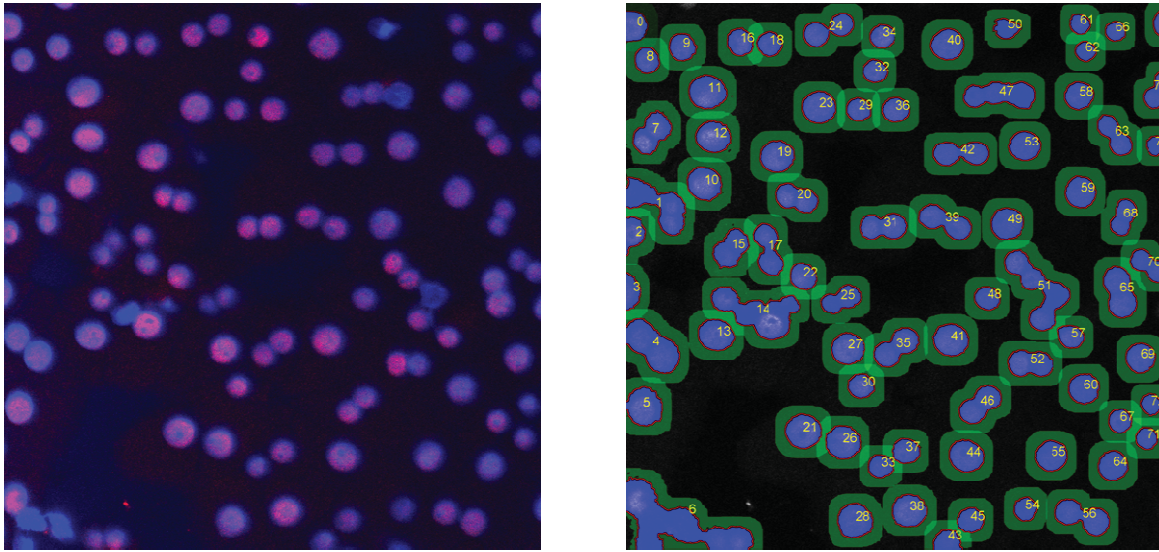


Abbildung 11 Messung der Fluoreszenzsignale mit dem Zeta Batch UKD Configuration Manager V 1.0 Berechnet wurde im rechten Bild das Verhältnis der mittleren Intensität des Zellkerns (blaues Areal) zur mittleren Intensität eines Bereichs um den Zellkern (grünes Areal, Cytoplasma). Die Werte aller ausgewerteten Zellen des Bildes wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Glucose Konzentration: 1g/l, cy3 für Glucokinase, Hoechst blau für Nucleus

Zur quantitativen Auswertung der Translokation wurde der Quotient aus dem Fluoreszenzsignal

(I = Intensität) des Zellkerns (ZK) und des Zytoplasmas (Cyt) berechnet und angewendet (I_{ZK} / I_{Cyt}).

Die Auswertung der Versuchsreihen zeigt die Wirkung der steigenden Glucosekonzentrationen auf die Lokalisation der Glucokinase gemessen an der mittleren Intensität des Bereichs im Zellkern gegenüber dem Zytoplasma, wie beispielhaft in Abbildung 11 dargestellt. Die y-Achse in Abbildung 12 gibt den Quotienten der gemittelten Intensitäten der Fluoreszenzsignale der Glucokinase im Zellkern (I_{ZK}) und im Zytoplasma (I_{Cyt}) wieder und ist damit ein Maß der Verteilung der GK in diesen beiden Zellkompartimenten. Je niedriger der Quotient ist, desto mehr Signal wird im Bereich des Zytoplasmas gemessen. Dieser Bereich um den Zellkern ist repräsentativ für das gesamte Kompartiment des Zytoplasmas und entspricht damit einer Lokalisation der Glucokinase außerhalb des Nucleus. In Abbildung 12 wird die Translokation durch die Veränderung des Quotienten mit steigender Glucosekonzentration verdeutlicht.

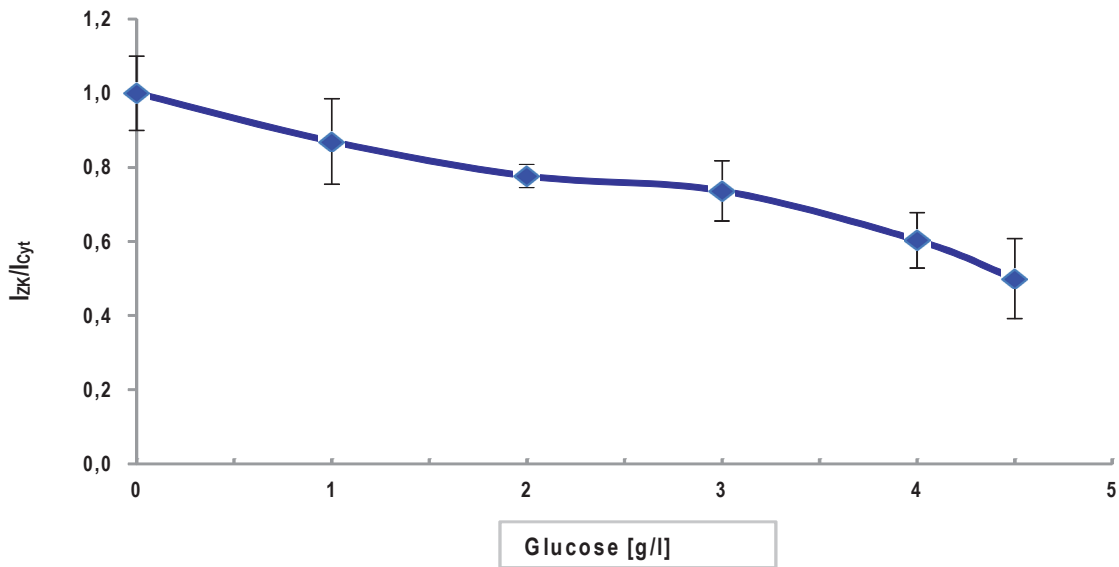


Abbildung 12 Einfluss der Glucosekonzentration auf die Lokation der Glucokinase normalisiert auf 0 g/l Glucose. Dosisabhängige Translokation der GK gemessen an Hand des Fluoreszenzsignals im Zellkern und im Zytoplasma. Durch die Steigerung der Glucose-Konzentration im Medium wird die Translokation der GK aus dem Zellkern ins Zytoplasma stimuliert.

Durch die Verwendung des Intensitätsquotienten kann die Beeinflussung der Translokation durch unterschiedliche Bedingungen direkt verglichen werden. Die Zugabe von Sorbitol zeigt die Veränderung der Intensitätswerte wie in Abbildung 13 zu sehen. Die Unterschiede bei der Höhe der Intensitätsquotienten zwischen Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen.

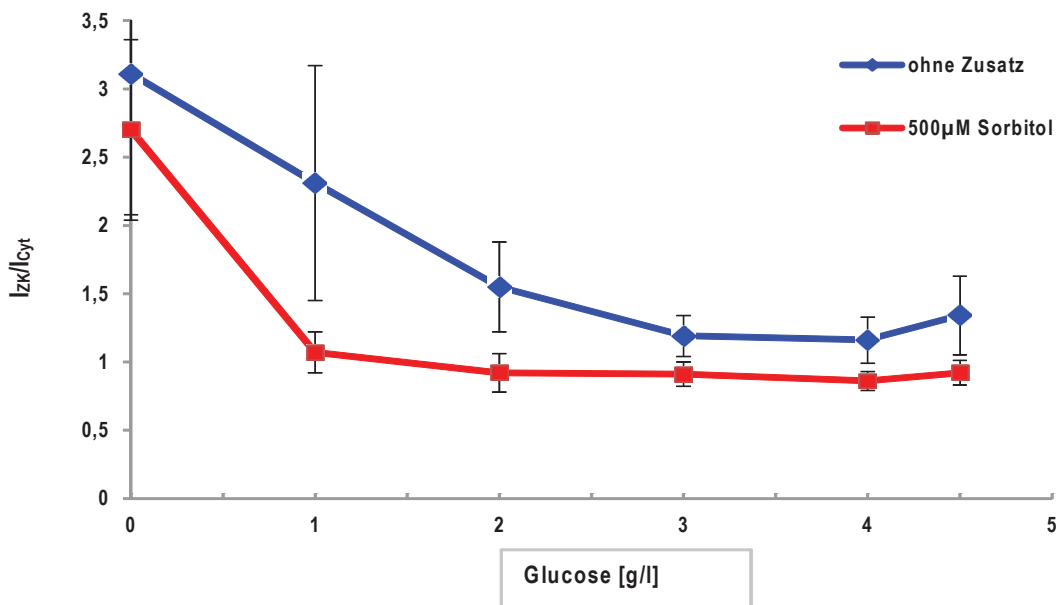


Abbildung 13 Sorbitol [500 µM] bedingt eine Steigerung der Translokation aus dem Zellkern ins Zytoplasma (\cong Abnahme des Quotienten I_{zk}/I_{cyt}).

Mit Hilfe der automatisierten Mikroskopie zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen ist es möglich, in kürzerer Zeit eine große Anzahl von Bildern auszuwerten unter Umgehung eines untersucherbedingten Bias. Durch Etablierung und Anwendung dieser Methode wurden in der Folge mögliche weitere Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Translokation getestet und analysiert. Wie zuvor beschrieben spielt Insulin eine entscheidende Rolle bei der Regulation der GK-Aktivität durch Steigerung der mRNA-Expression. In folgenden Untersuchungen sollte eine mögliche Regulation auf Translokationsebene näher betrachtet werden.

3.3.4. Insulin hat keinen aktivierenden Effekt auf die Translokation der GK

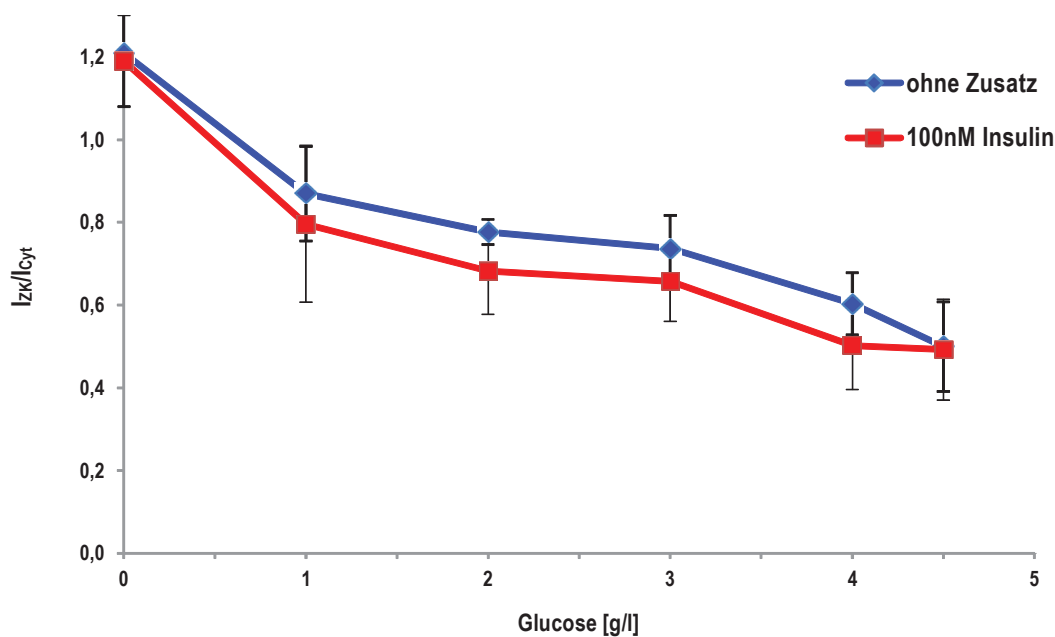


Abbildung 14 Insulin hat keinen signifikanten Effekt auf die Translokation aus dem Zellkern ins Zytoplasma. ($p=0,426$)

Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte durch die Verwendung von 100nM Insulin zur steigenden Glucosekonzentration keine signifikante Steigerung der Translokation gesehen werden ($p = 0,426$).

Um einen möglichen Zusammenhang zur aPKC zu untersuchen, wurde das Pseudosubstrat in den Untersuchungen verwendet. Die Hemmung der aPKC durch das Pseudosubstrat erfolgte wie beschrieben nach Vorbereitung der Zellen für zwei Stunden. Die Translokationsanalyse, wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigt keinen Einfluss durch Verwendung des Pseudosubstrats zur Hemmung der aPKC auf die Glucose induzierte Translokation der GK.

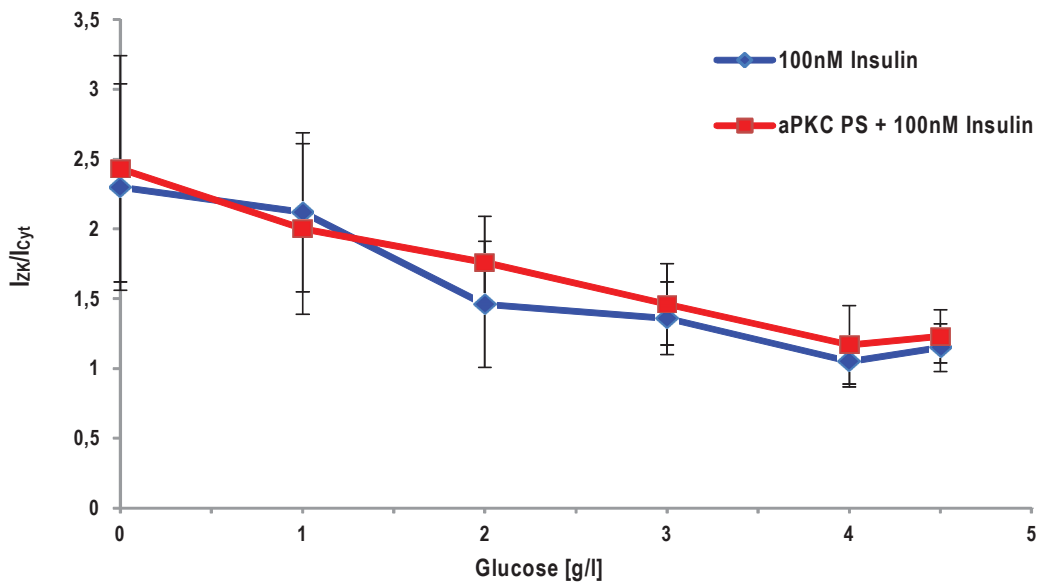


Abbildung 15 Die aPKC hat keinen Einfluss auf die Glucose-induzierte Translokation der GK. Durch den Einsatz des Pseudosubstrats (25 μ M) und Insulin (100nM) lässt sich keine Veränderung der Translokation nachweisen. ($p = 0,60$)

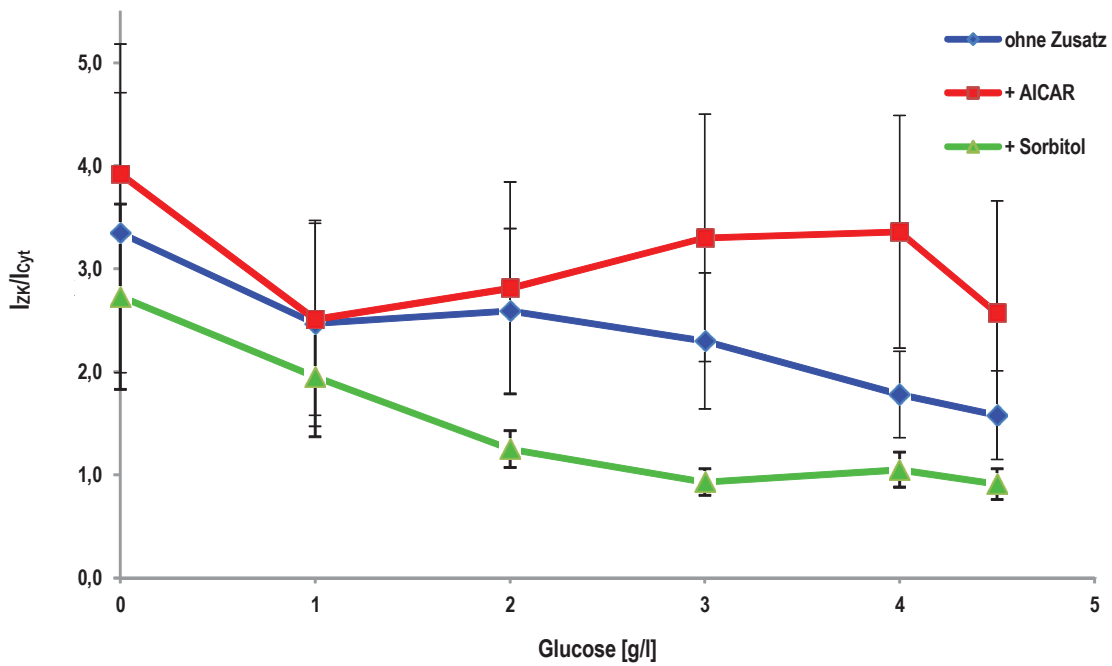


Abbildung 16 AICAR hat im Gegensatz zu Sorbitol einen inhibierenden Einfluss auf die Translokation der Glucokinase. Der Einsatz von AICAR (200 μ M) bewirkt eine geringere Translokation der GK bei steigenden Glucosekonzentrationen ($p = 0,031$)

5-Aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotid (AICAR) bewirkt eine Verminderung der Translokation der GK bei steigenden Glucosekonzentrationen wie in Abbildung 16 gezeigt. Die Hemmung der GK Translokation durch AICAR wird durch eine intrazelluläre ATP-abhängige Aktivierung der AMP-Kinase in den Hepatozyten hervorgerufen (Mukthar et al. 2008).

3.3.5. Die Verwendung von Summenhäufigkeitshistogrammen verdeutlicht die Translokation durch eine Verschiebung der Verteilungskurve

Zur Verdeutlichung insbesondere von geringgradigen Veränderungen der Translokation gemessen an möglichst vielen Zellen wurde in der Folge eine kumulative Auftragung in Form von kumulativen Histogrammen gewählt. Histogramme sind Darstellungen von Häufigkeitsverteilungen skaliertes Merkmale bei denen in diesen Experimenten die Häufigkeit der einzelnen Intensitätswerte aufgetragen wurden. Gemessen wurden die Intensitätswerte für jede einzelne Zelle im Verhältnis zur Gesamtheit. Eine Linksverschiebung des Graphen deutet wie in Abbildung 17 gezeigt auf eine gesteigerte Translokation der GK aus dem Zellkern in das Zytoplasma bei der untersuchten Bedingung gegenüber der Kontrolle hin.

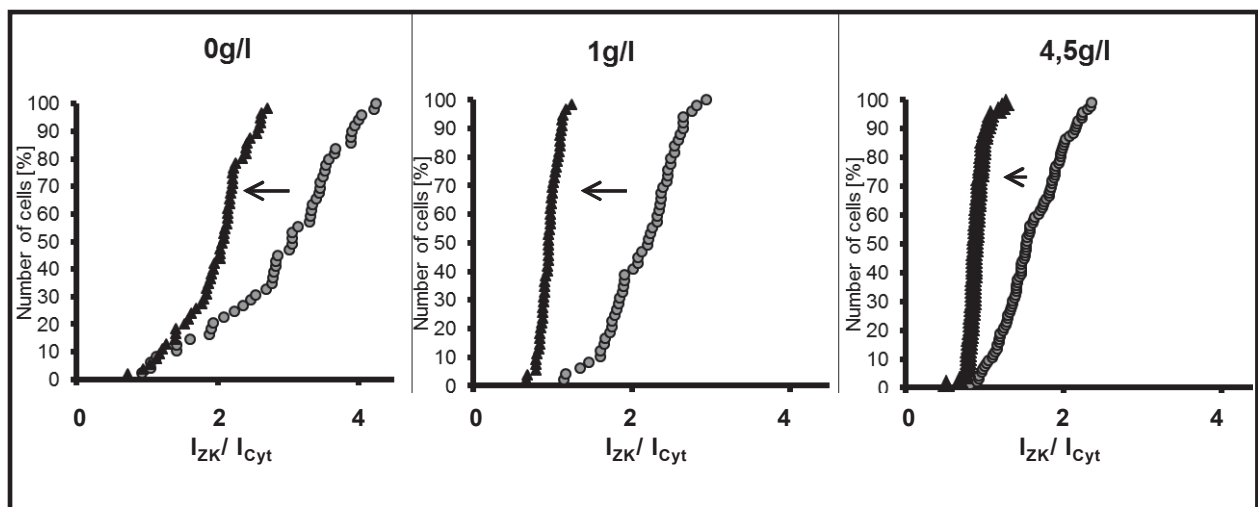


Abbildung 17 Einfluss von Sorbitol auf die Translokation der GK, ● = ohne Zusatz, ▲ = Zugabe von 500 µM Sorbitol; Wie vorgeschrieben aktiviert Sorbitol die Translokation der GK, hier ausgedrückt durch eine Linksverschiebung der Verteilungskurve. Die Werte auf der X-Achse zeigen den Intensitätsquotienten. Es ist eine Änderung des Quotienten unter allen drei Glucosekonzentrationen (0g/l, 1g/l, 4,5g/l) nachweisbar.

3.3.6. Einfluss der Gallensäuren auf die Kinetik der Translokation der GK

Gallensäuren steuern wichtige Signaltransduktionsvorgänge und besitzen hormonähnliche Eigenschaften. Über den membranständigen Gallensalzrezeptor TGR5 haben Gallensalze Einfluss auf

verschiedene Schritte des Glucose-Metabolismus. In der Folge sollte mit Hilfe der automatisierten Bildanalyse untersucht werden, ob Gallensalze die Translokation der GK beeinflussen.

3.3.6.1. Die konjugierten Gallensäuren CDCA und GCDC haben keinen Einfluss auf die Translokation der GK

Zur Stimulation der Hepatozyten wurden jeweils die konjugierte Gallensäure GCDC und die nicht konjugierte Gallensäure CDCA in einer Konzentration von 50µM verwendet. CDCA ist eines der primären Gallensalze, das in den Hepatozyten gebildet wird und physiologisch an Taurin (TCDC) oder Glycin (GCDC) konjugiert vorliegt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Gallensalze die Regeneration und Zellproliferation von Hepatozyten fördern können (Huang et al. 2006), aber dass hohe Dosen von bestimmten Gallensäuren hepatotoxisch wirken und insbesondere mitochondriale Schäden hervorrufen und die Apoptoserate steigern. So konnte z.B. für die Gallensäure GCDC in Bereichen von Konzentrationen >100µM eine deutlich erhöhte Gallensalz-induzierte Apoptose bei isolierten Rattenhepatozyten gezeigt werden (Yerushalmi et al. 2001). Kongruent dazu fiel in ersten Versuchsansätzen nach Stimulation mit den Gallensäuren GCDC und CDCA in einer Konzentration von 100µM auf, dass Zeichen einer erhöhten Zelltoxizität und Apoptose vorhanden waren. Daher wurde in der Folge eine Konzentration von 50µM gewählt. Der Einsatz von GCDC bzw. CDCA zeigte in den Experimenten dieser Arbeit unabhängig von der gewählten Glucose-Konzentration keinen relevanten Effekt auf die Translokation der GK wie in Abbildung 18 (zu besseren Übersicht nur CDCA aufgeführt) dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurde Sorbitol (500µM) eingesetzt, wodurch die erwartete Translokation der GK aus dem Zellkern ins Zytoplasma jeweils nachgewiesen wurde.

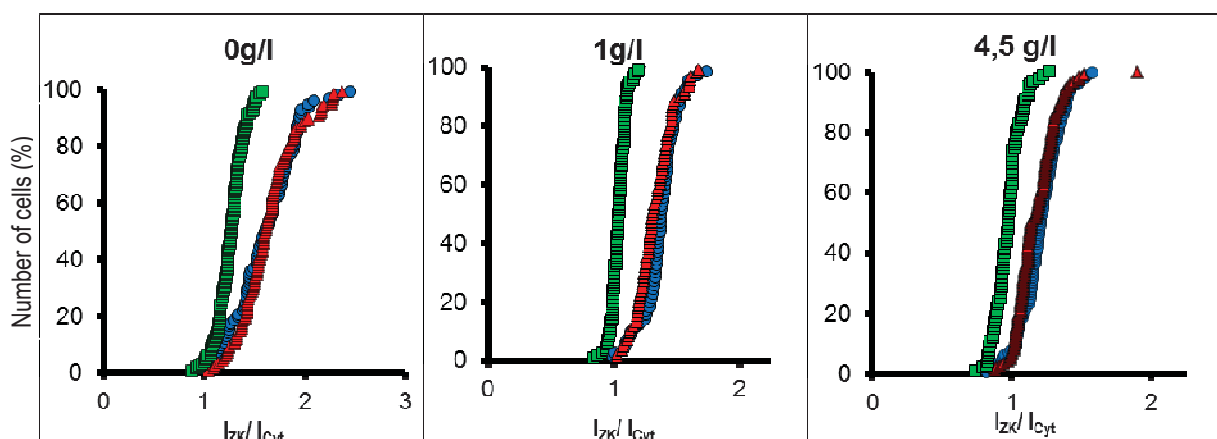


Abbildung 18 Die Gallensäure CDCA hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK. ● = Kein Zusatz, ▲ = 50µM CDCA, ■ = 500µM Sorbitol; Nach kumulativer Auftragung der Messwerte zeigt sich kein signifikanter Einfluss der Gallensäuren auf die Glucose-abhängige Translokation in dieser Konzentration.

4. Diskussion:

4.1. Die Inhibierung der α PKC ζ hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der GK

Vor Beginn dieser Arbeit wurde in einem Versuch der Einfluss des die atypischen PKCs hemmenden Pseudosubstrats auf Genebene untersucht, der mittels DNA-Microarray ausgewertet wurde (Gehrmann und Häussinger, 2008). Hier konnte eine signifikante Hemmung der GK-Expression gezeigt werden. Der in diesem Vorversuch gemessene inhibierende Effekt durch Einsatz des Pseudosubstrats auf die Genexpression der GK ließ sich im Rahmen dieser Arbeit durch die Versuche mittels qRT-PCR nicht weiter validieren bzw. nachweisen. Nach Auswahl und Validierung der spezifischen Primer und Optimierung der Versuchsbedingungen vor Stimulation konnten die versuchsinternen Schwankungen behoben werden. Die qRT-PCR wird heutzutage als adäquateste Methode zur Validierung oder Widerlegung von DNA-Microarray-generierten Daten angesehen (Provenzano und Mocellin 2007). Verschiedene Studien zur Vergleichbarkeit der beiden unterschiedlichen Methoden zur Messung der Genexpression wurden durchgeführt, wobei mehrheitlich eine ausreichende bis gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden in Bezug auf die Messung der mRNA-Expression gesehen wurde (Morey et al. 2006). Dies gilt besonders bei Genen, die ein moderates Expressionslevel aufweisen und bei denen der gewählte Primer in der Nähe der Microarray-Probe liegt. Jedoch bestehen bei Genen mit hohen bzw. niedrigen Expressionsniveaus sowie bei Primern, die entfernt von den Microarray-Proben liegen, zum Teil signifikante Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Methoden und somit eine geringere Übereinstimmung (Etienne et al. 2004).

Da der zu untersuchende Effekte bereits auf dem Level der mRNA-Expression mittels qRT-PCR nicht nachgewiesen werden konnte und erste Versuche auf Proteinebene mittels Westernblot (nicht gezeigt) keinen signifikanten Einfluss des PS auf die Expression der GK zeigte, wurde eine Analyse auf Proteinebene in der Folge nicht weiter durchgeführt. Unter der Annahme, dass ein möglicher Effekt der α PKCs auf die GK unter dem Einfluss von Insulin erfolgt (Farese et al. 2014), wurde die Stimulation mit Insulin als weitere Variable gewählt.

4.2. Insulin stimuliert die Expression der GK und inhibiert die Expression der G-6-Pase

Insulin hat einen wichtigen hormonellen Einfluss auf die Aktivität und die Expression der GK (Agius 1993). Bekanntermaßen kommt es durch Insulin zu einer Steigerung der Synthese der GK und reziprok zu einer Hemmung der Expression der G-6-Pase. Die eigenen Versuche konnten den Einfluss von Insulin auf die Expression der reziprok regulierten Enzyme GK und der G-6-Pase reproduzieren. Dies kann als interne Validitätskontrolle genutzt werden. Hierbei zeigt sich nach Stimulation mit 100nM Insulin, dass es zu einem deutlichen Anstieg der mRNA Synthese der GK kommt. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist bis dato nicht bis ins Detail geklärt. Eine Beteiligung der intrazellulären Signalkaskade über die PI3-Kinase sowie die Proteinkinase B ist jedoch belegt (Ilyedjian 2009). Ferner ist bekannt, dass die PI3-Kinase ebenfalls an der Aktivierung der aPKCs beteiligt ist und die aPKC als Downstream-Target des IRS-PI3-Kinase Signalwegs fungieren. Aufgrund dieser Zusammenhänge schien ein Einfluss der aPKC auf die Expression der GK möglich. In den durchgeführten qRT-PCR ließ sich kein signifikanter Einfluss der aPKC durch eine PS abhängige Hemmung nachweisen.

Das regulatorische Protein GKRP bindet die GK im Zellkern. Es wird angenommen, dass die Funktion dieser Bindung in einer Konservierung der GK besteht, sodass eine schnelle Reaktivierung möglich ist und die GK nicht durch intrazelluläre Prozesse abgebaut wird. Die Analyse der mRNA-Expression des GKRP unter Stimulation von Insulin zeigte, dass Insulin keinen signifikanten Effekt auf die Expression des GKRP hat. Es ist bekannt, dass eine dauerhaft erhöhte Glucose-Konzentration im Rahmen einer Insulinresistenz eine vermehrte Genexpression des GKRP bewirkt (Brichard et al 1993), weitere Einflüsse auf die Expressionsregulation des GKRP sind bis dato nicht bekannt. Experimente mit Adenovirus-vermittelter Überexpression des GKRP (zweifache Erhöhung gegenüber der endogenen Expression) zeigten eine deutlich erhöhte Bindung an die GK und eine Reduktion der Glucose-Phosphorylierung, der Glycolyse und der Glycogensynthese und somit eine gestörten Glucose-Verwertung (Iglesia et al. 2000). Die eigenen Daten sprechen dafür, dass die Expressionszunahme der GKRP unter den oben beschriebenen Bedingungen (erhöhte Glucosekonzentration, Insulinresistenz) nicht durch Insulin vermittelt wird. Weitere Analysen bezüglich der Regulation des GKRP auf Genexpressionsebene sind notwendig.

4.3. Einflüsse auf die Translokation der Glucokinase zwischen Zellkern und Zytoplasma

Neben der beschriebenen wichtigen Regulation der Glucokinase durch die mRNA-Expression wurde die Verschiebung der Lokalisation des Enzyms aus dem Zellkern als kurzfristige Regulation der Enzymaktivität untersucht. Hierbei ist die Interaktion mit dem GGRP entscheidend, wobei niedrige Glucose-Konzentrationen bedingen, dass die GK im Zellkern gebunden an das regulatorische Protein bleibt. Die Erhöhung des Glucose-Spiegels führt in der Folge zu einer Dissoziation der beiden Proteine sowie zur Translokation der GK durch die Poren der nukleären Membran in das Zytoplasma und somit zur Aktivierung des Enzyms. Da diese Regulation ebenfalls entscheidend für die Aktivität der GK ist, folgten Versuche mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie, um weitere Einflüsse (u.a. der aPKCs) darauf zu untersuchen. Eine Translokation des regulatorischen Proteins konnte unter keinen Bedingungen beobachtet werden.

4.3.1. Die Hemmung der aPKC hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK

Hinweise auf einen möglichen Einfluss der aPKC auf die Translokation ergaben Untersuchungen, die nachweisen konnten, dass auch die atypischen Proteinkinase C durch NLS-Sequenzen (*nuclear localization signal*) in der Lage sind in den Nukleus zu translozieren (Perander et al. 2001). NLS-Sequenzen in Proteinen bestehen aus wenigen Aminosäuren und sind notwendig zur Bindung von anderen Proteinen, die wiederum den aktiven Transport aus dem Zytoplasma in den Zellkern begünstigen.

Ferner konnten Mukthar et al. zeigen, dass die AMP-K durch Aktivierung über AICAR (200µM) einen inhibierenden Einfluss auf die Translokation der GK besitzt. Dabei bewirkt AICAR eine Inhibition der Translokation durch Aktivierung der AMP-Kinase und Phosphorylierung von GGRP und der Phosphofruktokinase 2 (PFK-2) (Mukthar et al. 2008). Die Analyse der Stimulation durch AICAR in dieser Arbeit bestätigte den beschriebenen Effekt auf die Translokation in kultivierten Rattenhepatozyten (Abbildung 17). Das Antidiabetikum Metformin ist ebenfalls ein Aktivator der AMP-Kinase, Mausmodell-Analysen legen nahe, dass ein Wirkmechanismus des Metformins die Aktivierung der aPKCs und der damit erhöhten Insulinsensitivität sein könnte (White 2009). In humanen Hepatozyten konnte nachgewiesen werden, dass Metformin und AICAR die aPKC aktivieren (Sajan et al. 2013). Ferner zeigten Guigas et al., dass Metformin interessanterweise eine Inhibition der Glucose-induzierten Translokation der GK bewirkt, wobei eine reduzierte intrazelluläre ATP-Konzentration

entscheidend zu sein scheint (Guigas et al. 2006). Andere Arbeitsgruppen konnten kongruent dazu zeigen, dass eine erhöhte ATP-Konzentration die Bindungsaffinität zwischen der GK und dem GKRP erniedrigt und somit die Translokation begünstigt wird (Anderka et al. 2008).

Daher erschien ein möglicher Zusammenhang zwischen der Regulation der GK Translokation und der aPKC Aktivierung bzw. Hemmung durch das Pseudosubstrat untersuchungsbedürftig. In den Messungen der Immunfluoreszenzanalysen ließ sich diesbezüglich kein direkter Einfluss durch die aPKC nachweisen. In der Folge ergab sich die Frage, ob Insulin allein einen Einfluss auf die Translokation der GK ausübt, unabhängig einer aPKC abhängigen Aktivierung.

4.3.2. Die Stimulation durch Insulin bewirkt keine Aktivierung der Translokation der GK

Um zu untersuchen, ob Insulin einen Effekt auf die Translokation der GK hat, wurden Konzentrationsreihen mit steigender Glucosekonzentration und einer zusätzlichen Stimulation mit Insulin durchgeführt. Der Einfluss von Insulin in diesem Zusammenhang wird in der Literatur nicht eindeutig belegt. Agius und Peak konnten an Digitonin permeabilisierten Hepatozyten zeigen, dass der Effekt durch Glucose (10-30mM) auf die Translokation durch Insulin (10nM) verstärkt wird (Agius und Peak 1993). Ebenso wurde in Perfusionsexperimenten in Rattenlebern ein ähnlicher verstärkender Effekt durch Insulin demonstriert (Toyoda et al. 1994). Ferner konnten Chu et al. durch die Erhöhung der Plasmakonzentration von Insulin (20-25 mg/ml im Plasma) in lebenden Ratten nach sechsständigem Fasten auch ohne zusätzliche Gabe von Glucose einen steigernden Effekt auf die Translokation zeigen (Chu et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigten andere Untersuchungen an kultivierten Rattenhepatozyten einen hemmenden Effekt durch Glucagon auf die Freisetzung der GK aus dem Zellkern ohne einen Effekt durch Insulin (Brown et al. 1997).

Eine erhöhte Glucose-Konzentration bewirkt einen Wechsel der Lokalisation der GK ins Zytoplasma. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Hinzunahme von Insulin neben der Geneexpressionsteigerung der Glucokinase keine Steigerung der Translokation der GK bewirkt.

4.3.3. Sorbitol ist ein starker Aktivator der Translokation

Sorbitol wurde bereits als starker Aktivator der GK-Translokation aus dem Zellkern ins Zytoplasma beschrieben. Nach Aufnahme in die Zelle wird Sorbitol in Fructose-1-Phosphat umgewandelt und interagiert mit der Translokation der GK. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sorbitol allein bereits eine Translokation der GK bedingen kann, diese wird in Anwesenheit von Glucose um ein vielfaches gesteigert. Die erhöhte Translokationsrate ließ sich unter wechselnden Glucosekonzentrationen konstant nachweisen, sodass für folgende Untersuchungen der Zusatz von Sorbitol als Kontrollvariable genutzt wurde. Interessanterweise kommt es nach Einsatz von hohen Glucosekonzentrationen zu einem gemeinsamen Endpunkt der Translokation, sodass eine Beschleunigung der Translokationsrate wahrscheinlich ist, die nach einer bestimmten Konzentration nicht weiter gesteigert werden kann. Glucose kann durch die Aldosereduktase NADPH⁺-abhängig zu Sorbitol umgewandelt werden und ist der erste Schritt bei der Bildung von Fructose aus Glucose ohne ATP-Verbrauch. Agius konnte zeigen, dass durch die Hemmung der Aldosereduktase (AR) die Translokation der GK durch Glucose inhibiert wird, nicht aber der Effekt von Sorbitol (Agius et al. 1994). Dies könnte bedeuten, dass physiologischerweise eine intrazelluläre Umwandlung von Glucose in Sorbitol bei erhöhter intrazellulärer Konzentration ein weiterer Mechanismus ist, die Translokation der GK zu fördern, um das anfallende Substrat schneller zu metabolisieren und schädliche Hyperglykämien zu verhindern wie in Abbildung 20 schematisch dargestellt

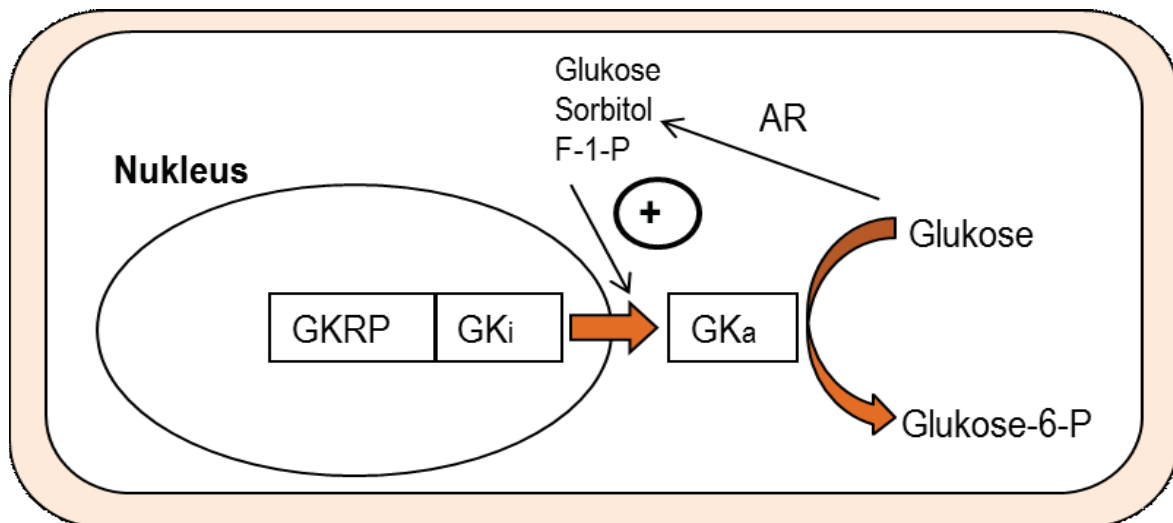


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Umwandlung von Glucose in Sorbitol. AR = Aldosereduktase; Die GK transloziert aus dem Nukleus und wird aktiv. Sorbitol steigert die Translokation der GK aus dem Zellkern. I= inaktiv, a = aktiv

4.4. Automatisierte Bildauswertung zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen, die Translokation der GK zur Etablierung einer Methode

Die Methode der automatisierten Bildauswertung zur Analyse subzellulärer Verteilung von Proteinen konnte im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Translokation der GK etabliert und genutzt werden. Durch den Einsatz dieser Methode ist es möglich mit Hilfe der Intensitätsmessung die Verteilung der durch fluoreszierende Antikörper markierten Proteine in einem bestimmten Zellkompartiment zu messen. Durch die Markierung des jeweiligen subzellulären Kompartiments (in diesem Falle dem Nukleus durch eine spezifische Färbung der DNA mit Hoechst 33342) können Lokalisationsveränderungen in einem beschleunigten Analyseprozess ohne Bias durch eine manuelle Analyse objektiviert werden. So kann unmittelbar nach Aufnahme eines Bildes im Mikroskop eine automatisierte Messung der Verteilung erfolgen. Hierzu wurden Bilder vom Untersucher im Fluoreszenzmikroskop ausgewählt und digital aufgenommen. Auswahlkriterien waren die Abbildung ausreichend vieler Zellen sowie die Einstellung der optimalen optischen Ebene. Die Zellen wurden anhand der Zellkernfärbung (Hoechst 33342) und nicht anhand der Zielproteins ausgewählt.

Zu Beginn der Auswertung werden in einer supervidierten „Lernphase“ der Zeta-Software die zu untersuchenden Kompartimente, in diesem Fall die Zellkerne, mit Hilfe einer foreground-background Detektionsfunktion erkannt (nach Domanova et al. 2011), um die Begrenzung des Kompartiments (hier: Zellkerne) bestimmen zu können.

Liegt eine repräsentative Erhebung mit homogenen Intensitätsverteilungen vor, können die erhobenen Parameter aus diesem „Lernprozess“ für die weiteren Datensätze und Bilder verwendet werden und die automatisierte Analyse mittels der Software kann für eine große Anzahl an Bildern in kurzer Zeit durchgeführt werden.

Die eigentlichen Messungen beinhalteten folgende Schritte: (1) Erstellung der digitalen Doppelfluoreszenz-Bilder, bei denen die Zellkerne (Hoechst 33342) in blau und das Zielprotein (GK) in rot dargestellt sind. (2) Ermittlung der Zellkerne anhand der Hoechst 33342-Färbung. (3) Ermittlung der GK-assoziierten Fluoreszenz, die entweder im Bereich der Zellkerne (IZK) oder in einem ringförmigen Areal (Ringbreite 1µm) um die Zellkerne (ICyt) lokalisiert ist. Hierbei wird die Intensität der einzelnen Pixel summiert. (4) Berechnung des Quotienten IZK/ICyt für jede einzelne Zelle.

Nach Abschluss der Bildaufnahme und automatisierten Analyse der Bilder ist aufgrund der Vielzahl der Daten die kumulative Auftragung der Messwerte (IZK/ICyt) in einem Summenhäufigkeitshistogramm eine geeignete Form der Darstellung. Durch die Auftragung der gemessenen Intensitätsquotienten in einer kumulativen Verteilungskurve können geringe Veränderungen in der Lokalisationsverteilung gut visualisiert werden. Dies gilt insbesondere wenn es sich um eine Vielzahl an Messpunkten handelt.

Diese Methode kann für etwaige Lokalisationsveränderungen innerhalb von Zellkompartimenten genutzt werden. Hierbei wird eine Veränderung der Verteilung durch eine Verschiebung des Graphen gegenüber der Ausgangsbedingung verdeutlicht.

4.4.1. Gallensäuren regulieren den Glucose Stoffwechsel, CDCA hat keinen Einfluss auf die Translokation der GK

Wie bereits beschrieben besitzen Gallensäuren neben der Emulsion von Fetten eine wichtige regulatorische Funktion auf verschiedene Signaltransduktionswege, insbesondere in Bezug auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Gallensalze binden an den spezifischen transmembranständigen Rezeptoren TGR-5, der in verschiedenen Zellen wie z.B. den Hepatozyten, Enterozyten oder Makrophagen exprimiert wird und haben Einfluss auf die Glucose-Homöostase. So führt z.B. die Aktivierung von TGR-5 zur gesteigerten Synthese von GLP-1 und zur vermehrten Insulinausschüttung zur Senkung des Blutzuckerspiegels (Li and Chiang 2012).

FXR ist ein intrazellulärer Rezeptor der Gallensäuren, der verschiedene Wirkungen auf Genebene durch Bindung an die DNA im Nukleus vermittelt. FXR ist vor allem in Leber, Darm und Niere exprimiert (Forman et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass FXR ebenfalls in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird und die Glucoseaufnahme (GLUT-2) sowie Glucose-abhängige Insulinsekretion und Expression fördert (Renga et al. 2010). Zudem ist die Induktion der FXR-abhängigen Zielgene durch Gallensäuren zum Teil abhängig von der Aktivierung der α PKC ζ durch Insulin (Zhou et al. 2014). Untersuchungen an FXR Knockout-Mäusen legen eine zentrale Rolle des FXR bei der Glucose-Homöostase nahe. Hier kam es bei den untersuchten Mäusen zu der Entstehung von Hypercholesterinämie, Triglycerinämie und erhöhter Insulinresistenz, Zustände ähnlich einer diabetogenen Stoffwechsellage (Ma et al. 2006).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Gallensäure TCA zu einer Aktivierung der Glycogensynthase (GS) über den Signalweg der Proteinkinase B (PKB) führt, was wiederum eine Förderung der Glycogensynthese bedingt. Dieser Mechanismus ist im Zustand einer Energiebilanz mit erhöhter Nahrungsaufnahme ein physiologischer Vorgang. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde eine mögliche Regulation anderer Schlüsselenzyme wie z.B. der GK-Translokation im Glucose-Metabolismus als untersuchungswürdig erachtet.

Eine mögliche weitere Fragestellung ist, ob Gallensalze einen regulatorischen Effekt auf die Gen-Expression von anderen Zielgenen im Glucosestoffwechsel besitzen. Verschiedene Studien legen nahe, dass Gallensalze die Expression von Genen, die in der Gluconeogenese involviert sind, wie z.B. die

PEP-CK, G-6-Pase und Fructose-1,6-biphosphatase beeinflussen. Der genaue Mechanismus dieser Genexpressionsregulation ist bis dato jedoch unklar (Yamagata et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gallensalze CDCA und GCDC untersucht (Daten für GCDC nicht aufgeführt). Unter Stimulation mit einer Dosis von 50 μ M konnte kein Effekt auf die Translokation der GK gezeigt werden. Die Gallensäure CDCA wurde gewählt, da sie einen großen Anteil der physiologischen Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit ausmacht. Eine Expressionsanalyse im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen erhöhten Gallensalzkonzentrationen und der Regulation der GK-Expression erscheint im Ausblick sinnvoll.

5. Zusammenfassung

Proteinkinasen der Gruppe C (PKC) sind wichtige Enzyme intrazellulärer Signalkaskaden und steuern zahlreiche Abläufe in verschiedensten Zellen. Die Proteinkinase C-Isoformen werden in Abhängigkeit ihres Aktivierungssignals in drei Gruppen eingeteilt: klassische PKCs, novel PKCs und atypische PKCs. Die Aktivität der atypischen PKCs (aPKCs) wird u.a durch Bindung des inhibitorischen Pseudosubstrats (PS) negativ reguliert. Um den Einfluss der aPKCs auf die Genexpression verschiedener Proteine in Leberzellen zu untersuchen, wurde in einem Vorversuch zu diesem Projekt das inhibitorische Pseudosubstrat eingesetzt und das Transkriptom mittels eines DNA MicroArrays ausgewertet. Ergebnis dieses Versuchs war (u. a.) eine signifikante Hemmung der Expression der Glucokinase (GK) nach Zugabe des PS. Ziel dieser Arbeit war es den o.g. Effekt durch weitere Methoden zu validieren. Die GK ist ein wichtiges Enzym für die Regulation des Blutglucosespiegels und phosphoryliert Glucose als erster Schritt der Glykogensynthese.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der im Vorfeld gesehene Effekt des PS auf die Expression der GK nicht validiert werden, während die Steigerung der mRNA-Synthese durch Insulin bestätigt wurde.

Neben der Expression wird die Aktivität der GK durch Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zellen reguliert. Hohe intrazelluläre Glucose-Konzentrationen bewirken eine Translokation des Enzyms aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wohingegen die GK bei niedrigen Glucose-Spiegeln im Zellkern inaktiv durch das *Glucokinase-Regulatory-protein* (GKRP) gebunden wird. In dieser Arbeit wurde die GK-Translokation mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Versuchen und einer neuen Methode zur automatisierten Bildanalyse (Zeta Batch UKD Configuration Manager beta V 1.0) unter dem Einfluss von Insulin und dem PS im Vergleich zu bekannten Effektoren der GK-Translokation (Glucose, Sorbitol oder AICAR) gemessen. Weder Insulin noch das PS zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Glucose-induzierte Translokation der GK ins Zytoplasma. Auch Gallensäuren, die über verschiedene Mechanismen mit der Glucosehomeostase interferieren können, hatten keinen signifikanten Effekt auf die Translokation der GK.

Referenzen:

Agius L. *The physiological role of glucokinase binding and translocation in hepatocytes.* 1998 Adv Enzyme Regul 38:303–31

Agius L, Peak M. *Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin.* 1993 Biochem J. 296 (Pt 3):785-96

Agius L. *Control of glucokinase translocation in rat hepatocytes by sorbitol and the cytosolic redox state.* 1994 Biochem J. 298 (Pt 1):237-43

Alvarez E, Roncero I, Chowen JA, Vázquez P, Blázquez E. *Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain.* 2002 Journal of Neurochemistry 80: 45–53

Anderka O, Boyken J, Aschenbach U, Batzer A, Boscheinen O, Schmoll D. *Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: impact of physiological and pharmacological effectors.* 2008 J Biol Chem. 283(46):31333-40

Arden C, Baltrusch S, Agius L. *Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes.* 2006 FEBS Lett 580(8):2065-70

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Kikkawa U, Ono Y, Moscat J and Farese RV. *Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda.* 1999 Biochem. J. 337: 461-470

Bjorkoy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T. *Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C lambda is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity.* 1997 J Biol Chem. 272(17):11557-65

Bonadonna RC, Heise T, Arbet-Engels C, Kapitza C, Avogaro A, Grimsby J, Zhi J, Grippo JF, Balena R. *Piragliatin (RO4389620), a novel glucokinase activator, lowers plasma glucose both in the postabsorptive state and after a glucose challenge in patients with type 2 diabetes mellitus: a mechanistic study.* 2010 J Clin Endocrinol Metab. 95(11):5028-36

Bosch RR, Bazuine M, Span PN, Willems PH, Olthaar AJ, van Rennes H, Maassen JA, Tack CJ, Hermus AR, Sweep CG. *Regulation of GLUT-1-mediated glucose uptake by PKC λ -PKC β (II) interactions in 3T3-L1 adipocytes.* 2004 Biochem J. 1;384(Pt 2):349-55

Brichard SM, Henquin JC, Girard J. *Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism.* 1993 Diabetologia. 36(4):292-8

Brown KS, Kalinowski SS, Megill JR, Durham SK, Mookhtiar KA. *Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus.* 1997 Diabetes. 46(2):179-86

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB.* 2005 Nat Med.,11(2):183-90

Chen HC, Bandyopadhyay G, Standaert M, Farese Jr RV, Farese RV. *Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport.* 2002 J. Biol. Chem. 277 (26)

Chomczynski P, Sacchi N. *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction,* 1987 Analytical Bioch. 162: 156- 159

Chu CA, Fujimoto Y, Igawa K, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA, Cherrington AD, Shiota M. *Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats.* 2004 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 286(4): 627-34

Coghlan M, Leighton B. *Glucokinase activators in diabetes management.* 2008 Expert Opin Investig Drugs., 17(2):145-67

Cohen DE. *Pathogenesis of gallstones. In Hepatology: A Textbook of Liver Disease.* 2003 Zakim D, Boyer TD pp 1713–1743

Coope GJ, Atkinson AM, Allott C, McKerrecher D, Johnstone C, Pike KG, Holme PC, Vertigan H, Gill D, Coghlan MP, Leighton B. *Predictive blood glucose lowering efficacy by Glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats.* 2006 Br J Pharmacol.,149(3):328-35

Cori GT, Cori CF. *Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease.* 1952 J Biol Chem., 199(2):661-7

Domanova O, Borbe S, Mühlfeld S, Becker M, Kubitz R, Häussinger D, Berlage T. *Evaluating descriptors for the lateral translocation of membrane proteins.* 2011 Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.; 2011:6597-600;

Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J. *Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation.* 2003 EMBO J. 1;22(15):3910-8

Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA Jr. *Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray.* 2004 Biotechniques, 36(4):618-20, 622, 624-6

Fang Y, Studer E, Mitchell C, Grant S, Pandak WM, Hylemon PB, Dent P. *Conjugated bile acids regulate hepatocyte glycogen synthase activity in vitro and in vivo via Galphai signaling.* 2007 Mol Pharmacol.,71(4):1122-8

Farese RV, Lee MC, Sajan MP. *Atypical PKC: a target for treating insulin-resistant disorders of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus.* 2014 Expert Opin Ther Targets, 18(10):1163-75

Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. *Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes.* 2005 Exp Biol Med (Maywood), 230(9):593-605

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C. *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites.* 1995 Cell., 81(5):687-93

Fujimoto Y, Donahue EP, Shiota M. *Defect in glucokinase translocation in Zucker diabetic fatty rats.* 2004 Am J Physiol Endocrinol Metab. 287(3):E414-23

Grimsby J, Coffey JW, Dvoroziak MT, Magram J, Li G, Matschinsky FM, Shiota C, Kaur S, Magnuson MA, Grippo JF. *Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice.* 2000 J Biol Chem., 17;275(11):7826-31

Gregori C, Guillet-Deniau I, Girard J, Decaux JF, Pichard AL. *Insulin regulation of glucokinase gene expression: evidence against a role for sterol regulatory element binding protein 1 in primary hepatocytes.* 2006 FEBS Lett. 23;580(2):410-4

Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, Andreelli F, Viollet B, Hue L. *5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation.* 2006 Diabetes, 55(4):865-74

Hansmannel F, Mordier S, Iyenedjian PB. *Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor.* 2006 Biochem J., 399(Pt 2): 275–283

Hiskett EK, Suwitheecon OU, Lindbloom-Hawley S, Boyle DL, Schermerhorn T. *Lack of glucokinase regulatory protein expression may contribute to low glucokinase activity in feline liver.* 2009 Vet Res Commun.;33(3):227-40

Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore D.

Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. 2006 Science, 14; 312(5771):233-6

Iglesia N, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L. *The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte.* 2000 J Biol Chem. 7; 275(14):10597-603

Ilyedjian PB, Gjinovci A, Renold AE. *Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats.* 1988 J Biol Chem., 263(2):740-4

Ilyedjian PB. *Mammalian glucokinase and its gene.* 1993 Biochem J.; 293(Pt 1): 1–13

Ilyedjian PB. *Molecular Physiology of Mammalian Glucokinase.* 2009 Cell. Mol. Life Sci. 66

Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matschinsky FM, Magnuson MA. *Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut.* 1994 J Biol Chem., 269(5):3641-54

Kaminski MT, Schultz J, Waterstradt R, Tiedge M, Lenzen S, Baltrusch S. *Glucose-induced dissociation of glucokinase from its regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export.* 2014 Biochim Biophys Acta. 1843(3):554-64

Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y. *Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase.* 2004 Structure,12(3):429-38

Keitel V, Kubitz R, Häussinger D. *Endocrine and paracrine role of bile acids.* 2008 World J. Gastroenterol. 7; 14(37):5620-9

Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Payá CV, Moscat J., *Activation of Ikappa B kinase beta by protein C kinase isoforms.* 1999 Mol. Cell. Biol 19, 2180-2188

LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, 2004 3rd edn (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia)

Li T, Chiang JY. *Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases.* 2012 J Lipids, Article ID 754067

Lin YC, Chang PF, Chang MH, Ni YH. *Genetic variants in GCKR and PNPLA3 confer susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in obese individuals.* 2014 Am J Clin Nutr, 99(4):869-74

Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method,* 2001 Methods; 25(4):402-8

Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie.* 2014 Springer – Verlag 9. Auflage

Mackay H, Twelves CJ. *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* 2008 Nature Reviews Cancer 7(7):554-62

Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. *Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis.* 2006 J Clin Invest. 116(4):1102-9

Matschinsky FM. *Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy.* 2009 Nature Reviews Drug Discovery 8, 399-416

Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, Hiramatsu R, Shimano H, Yamada N, Ohno S, Kasuga M, Noda T. *PKCλ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity.* 2003 J Clin Invest. 112(6):935-44

McCarthy MI, Froguel P. *Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes.* 2002 Am J Physiol Endocrinol Metab. 283(2):E217-25

Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, Davies MJ, Kaufman KD, Goldstein BJ. *Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes.* 2011 *Diabetes Care*, 34(12):2560-6

Miller SP, Anand GR, Karschnia EJ, Bell GI, LaPorte DC, Lange AJ. *Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype.* 1999 *Diabetes*; 48(8):1645-51

Moeschel K, Beck A, Lehmann R. *Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1.* 2004 *J. Biol. Chem.* 279, 25157

Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. *Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR.* 2006 *Biol ; 8:* 175–193

Moscat J, Diaz-Meco MT. *The atypical protein kinase Cs, review.* 2000 *EMBO reports* vol.1, no.5, pp399-403

Mukhtar MH, Payne VA, Arden C, Harbottle A, Khan S, Lange AJ, Agius L. *Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.* 2008 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 294(3):R766-74

Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. *A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system.* 1978 *Biochem Biophys Res Commun*, 29;83(4):1360-4

Patel N, Rudich A, Khayat ZA, Garg R, Klip A. *Intracellular segregation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate by insulin-dependent actin remodeling in L6 skeletal muscle cells.* 2003 *Mol. Cell. Biol.* 23: 4611

Petta S, Miele L, Bugianesi E, Cammà C, Rosso C, Boccia S, Cabibi D, Di Marco V, Grimaudo S., Grieco A, Pipitone RM, Marchesini G, Craxì A. *Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease.* 2014 PLoS One, 3;9(2):e87523

Perander M, Bjorkoy G, Johansen T. *Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda.* 2001 J Biol Chem., 20;276(16):13015-24;

Postic C, Shiota M, Magnuson MA. *Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis.* 2001 Recent Prog Horm Res.;56:195-217

Provenzano M, Mocellin S. *Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR.* 2007 Adv Exp Med Biol.;593:66-73

Qiagen RNeasy Mini Handbook 2006 4.Auflage S.14

Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S. *The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion.* 2010 Biochim Biophys Acta., 1802(3):363-72

Roth U, Curth K, Unterman TG, Kietzmann T. *The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway.* 2004 J Biol Chem. 23;279(4):2623-31

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.* 1990 Nucleic Acids Res (Nucleic acids research) 18(21):6409-12

Sajan MP, Rivas J, Li P, Standaert ML, Farese RV. *Repletion of atypical protein kinase C following RNA interference-mediated depletion restores insulin-stimulated glucose transport.* 2006 J Biol Chem. 23;281(25):17466-73

Sajan MP, Ivey RA, Farese RV. *Metformin action in human hepatocytes: coactivation of atypical protein kinase C alters 5'-AMP-activated protein kinase effects on lipogenic and gluconeogenic enzyme expression.* 2013 *Diabetologia*, 56(11):2507-16

Schäfer C, Gehrmann T, Richter L, Keitel V, Köhrer K, Häussinger D, Schliess F. *Modulation of gene expression profiles by hyperosmolarity and insulin.* 2007 *Cell Physiol Biochem.*, 20(5):369-86

Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA. *Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase.* 1999 *J Biol Chem*, 274(52):37125-30

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan M, Farese RV. *Insulin and PIP3 Activate PKC- ζ by Mechanisms That Are Both Dependent and Independent of Phosphorylation of Activation Loop (T410) and Autophosphorylation (T560) Sites.* 2001 *Biochemistry*, 40 (1), pp 249–255

Stoughton RB. *Applications of DNA microarrays in biology.* 2005 *Annu Rev Biochem.* 74:53-82

Stross C, Keitel V, Winands E, Häussinger D, Kubitz R. *Expression and localization of atypical PKC isoforms in liver parenchymal cells* 2009 *Biol. Chem.*, Vol. 390, pp. 235–244

Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T. *Atypical protein kinase C is involved in the evolutionary conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures.* 2001 *J. Cell Biol.* 152, 1183-1196

Suzuki A, Akimoto K, Ohno S. *Protein Kinase C λ : APKC Isozyme Essential for the Development of Multicellular Organisms.* 2003 *J. Biochem.* 133, 9-16

Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kemphues KJ, Miwa J, Ohno S. *Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*.* 1998 *Development.* 125(18):3607-14

Toyoda Y, Miwa I, Kamiya M, Ogiso S, Nonogaki T, Aoki S, Okuda J. *Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes.* 1994 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204(1):252-6

Van Schaftingen E, Gerin I. *The glucose-6-phosphatase system.* 2002 *Biochem J.* 15;362(Pt 3):513-32;

Van Schaftingen E, Veiga da Cunha M. *Discovery and role of glucokinase regulatory protein.* *In Glucokinase and Glycemic Disease.* 2004 *From Basics to novel Therapeutics Vol 16,* pp. 193-207

Van Schaftingen E, Vandercammen, Detheux M, Davies DR. *The Regulatory Protein of Liver Glucokinase.* 1992 *Advan Enzyme Regul.* Vol. 32,pp. 133-148

White MF. *Metformin and insulin meet in a most atypical way.* 2009 *Cell Metab.,* 9(6):485-7

Wolff M, Kauschke SG, Schmidt S, Heilker R. *Activation and translocation of glucokinase in rat primary hepatocytes monitored by high content image analysis.* 2008 *J Biomol Screen;* 13(9):837-46

Yamagata K. *Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1.* 2004 *J. Biol. Chem.* 279:23158-23165

Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. *Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition.* 2001 *Hepatology,* 33(3):616-26

Zhou H, Hylemon PB. *Bile acids are nutrient signaling hormones.* 2014 *Steroids;*86:62-8

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.* 2001 *J Clin Invest.,* 108(8):1167-74

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und langjährigem Betreuer danken, Herrn Professor Dr. med. Ralf Kubitz, für die Vergabe des Themas, die kontinuierliche hervorragende Betreuung, die stetigen hilfreichen und guten Ratschläge während der Begleitung dieser Arbeit sowie für die gründlichen Korrekturen bei der Fertigstellung der Dissertation.

Herrn Professor Dr. med. D. Häussinger gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung und Möglichkeit diese Arbeit in den Laboratorien der experimentellen Hepatologie der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können. Besonders glücklich und dankbar bin ich für die Chance in der Folge meine klinische Ausbildung als Arzt in dieser herausragenden Klinik begonnen haben zu dürfen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt den geschätzten Kollegen der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Kubitz, Frau Dr. rer. Nat. Claudia Stroß, Frau Dr. rer. Nat. Stefanie Kluge und Frau Kathrin Weissenberger sowie dem gesamten Team der experimentellen Hepatologie für die ausgezeichnete Betreuung, Hilfestellung, Einarbeitung und lehrreichen Tips bei der Durchführung und Auswertung der experimentellen Versuche sowie für die stets herzliche und schöne Arbeitsatmosphäre im Labor.

Danken möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für die langjährige Unterstützung und Motivation. Ausdrücklich gilt mein großer Dank meinen Eltern und meinem Bruder für die Geduld und den unablässlichen Rückhalt in der ganzen Zeit. Meiner Lebensgefährtin Myriam danke ich herzlichst für die Liebe, das Vertrauen, ihr bedingungsloses Verständnis und die Hartnäckigkeit in den zurückliegenden Jahren mich bei der Fertigstellung der Dissertation voranzutreiben.

Eidesstattliche Versicherung

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift