

**Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert**

**Genexpressionshemmung des adipozytären
Glucose-dependent insulintropic Polypeptide Rezeptors mittels RNA Interferenz
und die Auswirkungen auf Lipidakkumulation und Zelldifferenzierung**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Torsten Schröder
aus Hamburg

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz
Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.2011
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 5.7.2011

Erfolg ist ein Gesetz der Serie und Mißerfolge sind Zwischenergebnisse. Wer weitermacht, kann gar nicht verhindern, daß er irgendwann auch Erfolg hat.

Thomas Alva Edison, (1847 - 1931)

meinen Eltern

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	III
III.	Einleitung	1
III.1.	Metabolisches Syndrom und Adipositas	1
III.2.	Fettgewebefunktion und Adipogenese	2
III.3.	Inkretine	4
III.3.1.	Metabolismus und Wirkung der Inkretine	4
III.3.2.	Inkretin-basierte Therapie	6
III.3.3.	GIP und Adipositas	6
III.3.4.	Voruntersuchungen	7
III.4.	RNA Interferenz	10
III.4.1.	Mechanismus der RNA Interferenz	11
III.4.2.	siRNA	11
III.4.3.	shRNA	12
III.4.4.	Keine Wirkung ohne Nebenwirkung	12
III.5.	Fragestellung	13
IV.	Material und Methoden	14
IV.1.	Material	14
IV.1.1.	Verwendete Geräte	14
IV.1.2.	Verbrauchsmaterialien	15
IV.1.3.	Chemikalien nach Hersteller	16
IV.1.4.	Kulturmedien und Puffer	18
IV.1.5.	Oil Red O Färbung	20
IV.1.6.	Weiteres Material für RNA Interferenz	20
IV.1.7.	PCR	22
IV.2.	Methoden	23
IV.2.1.	Zellmodel	23
IV.2.2.	Zellkultur	23
IV.2.3.	Zelldifferenzierung	24
IV.2.4.	Oil Red O-Färbung	24
IV.2.5.	RNA Interferenz	25
IV.2.5.1.	Transienter <i>Knock-down</i>	25
IV.2.5.2.	Stabiler <i>Knock-down</i>	27
IV.2.6.	RNA-Isolation	34
IV.2.7.	DNA-Verdau	34
IV.2.8.	Bestimmung der RNA-Menge	35
IV.2.9.	Gelelektrophorese	35
		I

IV.2.10.	Herstellung von cDNA	36
IV.2.11.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
IV.2.12.	Statistik und Darstellung	39
V.	Ergebnisse	40
V.1.	GIPR-KO-Zellen	40
V.2.	GIPR-Reexpression	41
V.3.	GIPR-Expression in Wildtypzellen während der Differenzierung	42
V.4.	Verwendung von siRNA zum transienten <i>Knock-down</i> in Wildtypzellen	42
V.4.1.	Transfektion mittels Elektroporation (Amaxa® Nucleofector®)	43
V.4.2.	Transfektion mittels lipophilen Transfektionsreagenz (Lipofectamine™ 2000)	45
V.5.	Verwendung von shRNA zum stabilen <i>Knock-down</i> des GIPR in Wildtypzellen	48
V.5.1.	GIPR-Expression	48
V.5.2.	Auswirkung auf die Lipidakkumulation	49
V.5.3.	Auswirkung auf die adipozytären Differenzierungsmarker (Pref1, PPAR γ , aP2)	54
VI.	Diskussion	57
VI.1.	Nachweis des GIPR	57
VI.1.1.	Validierung des GIPR- <i>Knock-Out</i> in den verwendeten Zelllinien	57
VI.1.2.	Validierung der GIPR-Reexpression in den GIPR-KI-Zelllinien	58
VI.1.3.	Bestimmung des GIPR-Expressionsprofils während der Adipogenese	59
VI.2.	<i>Knock-down</i> des GIPR	60
VI.2.1.	Transiente Hemmung der GIPR-Expression	61
VI.2.2.	Stabile Hemmung der GIPR-Expression	64
VI.2.3.	Auswirkung der GIPR-Hemmung auf die Fettzellendifferenzierung	64
VI.3.	Gewonnene Erkenntnisse	66
VII.	Zusammenfassung	67
VIII.	Literaturverzeichnis	68
IX.	Danksagungen	79
X.	Lebenslauf	80
XI.	Publikationsliste	81

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

≥	größer/gleich
≤	kleiner/gleich
° C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ Meter)
aP	Adipozytenprotein
BAT	<i>brown adipose tissue</i> (braunes Fettgewebe)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter (10 ⁻² Meter)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribunucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	<i>ethylendiamin-tetra-acid</i> (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (angereichertes grün fluoreszierendes Protein)
endo-siRNA	<i>endogenous small interfering RNA</i>
Epi	epididymal (vom Nebenhoden stammend)
ETB	Ethidiumbromid
exo-siRNA	<i>exogenous small interfering RNA</i>
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i> (auch: <i>Gastric inhibitory polypeptide</i>)
GIPR	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i> Rezeptor
GIPR-KI	GIP Rezeptor- <i>Knock-In</i> -Zellen (Zellen, die nach dem <i>Knock-Out</i> den GIPR wieder exprimieren)
GIPR-KO	GIPR Rezeptor- <i>Knock-Out</i> -Zellen (Zellen, in denen der GIPR fehlt)
GLUT	Glukosetransporter
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Plasma-Transportprotein für wasserunlösliche Stoffe)
Ing	inguinal (zur Leistengegend gehörend)
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK	Janus-Kinase
KI	Knock-In (Reexpression in <i>Knock-Out</i> -Zellen)

KO	<i>Knock-Out</i>
LB-Medium	LB (englisch lysogeny broth) ist ein Nährmedium für Bakterien nach Giuseppe Bertani
min	Minute(n)
miRNA	micro-RNA
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MC4R	Melanokortin-4-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
NEB2	New England Biolabs Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT)
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
OGTT	oraler Glukosetoleranztest (Screeningtest für Diabetes/Insulinresistenz)
Oligos	Oligonukleotide
PBS	<i>Phosphat-buffered Salin</i> (Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pref1	Präadipozytenfaktor 1
pre-miRNA	<i>precursor micro-RNA</i>
pri-miRNA	<i>primary micro-RNA</i>
Pro ³ GIP	GIP-Abbauprodukt durch die DPP IV mit antagonistischer Wirkung am GIP Rezeptor
PPAR γ	<i>Peroxisom Proliferator Activated</i> Rezeptor gamma
rGIPR	GIPR aus dem Rattengenom
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
vs.	versus (gegen)
WT	Wildtypzellen (unveränderte Zellen)
w/v	<i>weight per volume</i> (engl. für: Gewicht pro Volumen, spezifisches Gewicht)

III. EINLEITUNG

III.1. Metabolisches Syndrom und Adipositas

Das metabolische Syndrom steht im Zentrum des medizinischen Interesses, da es mit einem hohen Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen und auch Tumorerkrankungen einhergeht (Biddinger und Kahn, 2006) und damit zu den großen Gesundheitsbedrohungen der westlichen Welt gehört (Isomaa, 2003; Alberti *et al.*, 2005). Aufgrund unterschiedlicher Definitionen werden in Prävalenzstudien verschiedene Zahlen angegeben. In Deutschland liegt die Prävalenz für Männer zwischen 23,5 (NCEP-ATP III) und 31,6% (IDF) bzw. für Frauen zwischen 17,5 (NCEP-ATP III) und 22,6% (IDF) (Assmann *et al.*, 2007; Grundy, 2008).

Es ist schwierig, genau anzugeben, was das metabolische Syndrom umfasst, da nach wie vor keine eindeutige, allgemein anerkannte Definition existiert. Das metabolische Syndrom beinhaltet im Allgemeinen die folgenden Hauptkomponenten: Glukoseintoleranz, Adipositas, Bluthochdruck und Dyslipidämie (erhöhte Triglyzeride, zu wenig HDL-Cholesterin). Neben dem Konsens über diese Hauptbestandteile des Syndroms wird weiterhin viel über den Namen, weitere Kriterien und verschiedene Grenzen der einzelnen Kriterien diskutiert (Day, 2007). 1988 beschrieb Reaven das Syndrom X, in dessen Zentrum die Insulinresistenz stand (Reaven, 1988), also die verminderte Sensibilität der peripheren Körperzellen für Insulin. In der darauf folgenden Zeit wurde zum selben Kontext auch mit anderen Namen Bezug genommen, wobei sich der Begriff „metabolisches Syndrom“ bis heute am ehesten durchgesetzt hat. Interessanterweise stammt die erste Publikation, die das metabolische Syndrom beschreibt, aus dem Jahre 1923, als der Schwede Kylin Hyperglykämie, Hypertension und Gicht als metabolisches Syndrom zusammenfasste (Kylin, 1923).

Ziel der vielfältigen Debatten ist eine einheitliche Definition, die pathoätiologische Gesichtspunkte und klinische Kriterien genauso betrachtet wie Risikofaktoren und mögliche Begleiterkrankungen. Eine einheitliche Definition würde epidemiologische Studien ermöglichen und darüber hinaus als Grundlage für klinischen Diagnose- und Therapiealgorithmen dienen können.

1998 wurde von einer Arbeitsgruppe für die Weltgesundheitsorganisation eine Definition erarbeitet, die ebenfalls die Insulinresistenz ins Zentrum stellte (Alberti und Zimmet, 1998). Dabei blieb gerade die genaue klinische Definition der Insulinresistenz ein Problem, so kritisierten Balkau und Charles die WHO-Definition und schlugen 1999 in einer Arbeit für die „European Group for the Study of Insulin Resistance“ (EGIR) vor, das Syndrom stattdessen das „Insulinresistenzsyndrom“ zu nennen und schlossen Diabetespatienten aus dieser Definition aus (Balkau und Charles, 1999). Bereits 2001 wurde eine nächste Definition von den „Adult Treatment Panel III of the National Cholesterol Education Program“ (NCEP-ATP III) eingeführt, die eine einfache klinische Erfassung

ermöglichen sollte und beispielsweise auf den oralen Glukosetoleranztest als Screeningtest verzichtete (Grundy *et al.*, 2004). Klinisch ist heutzutage aber v.a. die Definition des metabolischen Syndroms von der „International Diabetes Foundation“ von Bedeutung (IDF, 2005). Dabei steht die Adipositas im Mittelpunkt des Syndroms und für die klinische Erfassung der Adipositas wird nur noch der Taillenumfang herangezogen, für den je nach ethischer Zugehörigkeit unterschiedliche Grenzwerte bestehen. Für Europäer gilt, dass Adipositas ab einem Taillenumfang von ≥ 94 cm bei Männern bzw. ≥ 80 cm bei Frauen vorliegt.

Die zunehmend populäre Definition des metabolischen Syndroms der IDF macht deutlich, dass inzwischen Adipositas als Schlüsselpunkt der Erkrankung angesehen wird. Das Fettgewebe wird als *critical link organ* für metabolische, endokrinologische, immunologische Funktionen, Reproduktion und Energiespeicherung verstanden (Iwen *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007) und rückt dadurch ins Interesse als mögliches Ziel therapeutischer Ansätze.

III.2. Fettgewebefunktion und Adipogenese

Die kritische Stellung des Fettgewebes wird durch verschiedene Adipokine gewährleistet, die das Fettgewebe zu einem endokrinen Organ machen. Als Adipokine werden biochemische Botenstoffe bezeichnet, die ausschließlich von Adipozyten sezerniert werden (Kershaw und Flier, 2004). Die veränderte Wahrnehmung des Fettgewebes als funktionell vielfältiges Organ begann 1994 mit der Identifikation von Leptin (Zhang *et al.*, 1994), das von Adipozyten produziert und sezerniert wird und selbst durch vielfältige Botenstoffe wie Insulin, Glukokortikoide oder Östrogen beeinflusst wird (Margetic *et al.*, 2002). Es musste von der Vorstellung Abschied genommen werden, dass das Fettgewebe ein inaktives, lediglich Energie speicherndes Gewebe ist. Inzwischen sind weitere durch Adipozyten produzierte und sezernierte Botenstoffe bekannt, wie TNF α , IL-6 (Fain *et al.*, 2004), Adiponektin (Chandran *et al.*, 2003) oder Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Goossens *et al.*, 2003), um nur einige zu nennen. Das Verständnis für die vielfältigen Funktionen des Fettgewebes wächst täglich (Rajala und Scherer, 2003; Kershaw und Flier, 2004; Perwitz *et al.*, 2004; Kraus *et al.*, 2005; Iwen *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006).

Die Adipogenese beschreibt die Entwicklung von Präadipozyten zu vollentwickelten Adipozyten. Während der Wachstumsphase sehen die Präadipozyten in der Zellkulturschale zunächst wie Fibroblasten aus, mit Erreichen der Konfluenz wird die Differenzierung induziert, die Zellen runden sich ab, lagern Fetttropfen ein und erlangen nach und nach die Eigenschaften und Funktionen reifer Adipozyten (Gregoire *et al.*, 1998; Farmer, 2006). Das Erreichen der Konfluenz bewirkt einen Wachstumsarrest, zuvor jedoch durchlaufen die Adipozyten eine sogenannte klonale Expansion, die durch ausgewogene mitogene und adipogene Signale verursacht wird. Dabei verdoppeln die Zellen wenigstens einmal ihr Erbgut und teilen sich (Gregoire *et al.*, 1998; Avram *et al.*, 2007).

Dieser Vorgang läuft i.d.R. automatisch ab, bei Arbeiten mit kultivierten Präadipozyten wird dieser Vorgang jedoch mit einem Induktionsmedium, das Dexamethason, Isobutylmethylxanthin und Indomethacin als geeignete adipogene Signalstoffe enthält, beschleunigt (Chapman *et al.*, 1985; Gaillard *et al.*, 1991; Smas und Sul, 1995; Gregoire *et al.*, 1998; Farmer, 2006).

Während der adipozytären Differenzierung ändern sich intrazelluläre Signalkaskaden grundlegend, so dass es zu charakteristischen Änderungen einiger Transkriptionsfaktoren kommt. Pref1 steht für „preadipocyte factor 1“ und wird in Präadipozyten gebildet (Gregoire *et al.*, 1998; Avram *et al.*, 2007). Pref1 hat einen inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung und wird daher mit Beginn der Induktion herabreguliert; so konnte gezeigt werden, dass Dexamethason durch eine Hemmung von Pref1 adipogen wirkt (Smas *et al.*, 1999). Es wurde auch gezeigt, dass Pref1 in verschiedenen Varianten vorkommt, von denen nur die große lösliche Form biologisch aktiv ist und die inhibitorische Wirkung ausübt (Mei *et al.*, 2002). PPAR γ gilt als wichtigster Transkriptionsfaktor der Adipogenese (Gregoire *et al.*, 1998; Harp, 2004; Hansen und Kristiansen, 2006; Rosen und Spiegelman, 2006; Avram *et al.*, 2007), da ohne PPAR γ eine Differenzierung nicht möglich ist (Farmer, 2006). PPAR γ ist für die Aufrechterhaltung der Differenzierung bedeutsam und an der Induktion von aP2 beteiligt, das als Fettsäure-bindendes Protein v.a. während der terminalen Differenzierung vorkommt (Gregoire *et al.*, 1998). Diese Transkriptionsfaktoren sind im Rahmen dieser Arbeit als Differenzierungsmarker bestimmt worden; eine schematische Darstellung dazu ist in Abbildung 1 zu sehen.

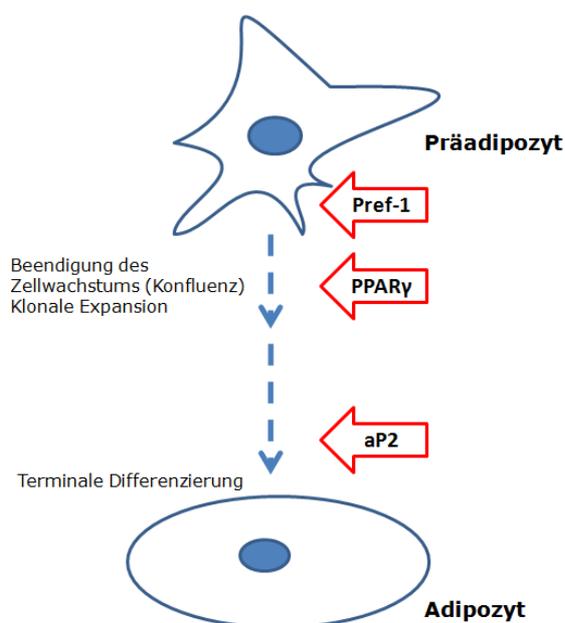


Abbildung 1: schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsmarker Pref1, PPAR γ und aP2 während der Fettzellendifferenzierung. Die Abbildung ist modifiziert nach Gregoire *et al.*, 1998.

III.3. Inkretine

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde postuliert, dass Botenstoffe aus der Darmschleimhaut als Antwort auf die Nahrungsaufnahme sezerniert werden und das endokrine Pankreas stimulieren. Die Pankreasstimulation induziert wiederum eine Insulinproduktion und –sekretion, was eine Verminderung der Blutglukose zur Folge hat (Moore, 1906). Diese Stoffe werden Inkretine genannt (LaBarre, 1932). Der glukosesenkende Effekt der Inkretine ist größer als man zunächst angenommen hatte. So konnte gezeigt werden, dass die orale Glukoseaufnahme eine stärkere Insulinantwort des Pankreas hervorruft als die intravenöse Glukosegabe (Elrick *et al.*, 1964; McIntyre *et al.*, 1964). Dieser Effekt wird als Inkretineffekt beschrieben und veränderte grundlegend das Verständnis über den postprandialen Metabolismus; man spricht dabei von der sogenannten enteroinsularen Achse (Unger und Eisentraut, 1969). Man geht heute davon aus, dass 50 bis 70% des sezernierten Insulin nach Nahrungsaufnahme durch Inkretine verursacht werden (Baggio und Drucker, 2007).

Von den heute bekannten Inkretinen wurde GIP zuerst entdeckt. Das Akronym stand zunächst für *Gastric Inhibitory Polypeptide* wegen der Eigenschaft, die Magensaftsekretion zu hemmen (Brown *et al.*, 1975). Diese Eigenschaft konnte jedoch nur in einer hohen Dosis beobachtet werden, so dass wegen des führenden glukoseabhängigen, insulinstimulierenden Effekts als Name überwiegend *Glucose-dependent insulintropic Polypeptide* verwendet wird und das Akronym erhalten bleibt.

Die weitere Forschung in diesem Bereich ergab, dass ein weiteres Inkretin vorhanden sein muss (Bell *et al.*, 1983), welches einen wesentlichen Teil zur Glukosesenkung beiträgt. Wegen einer Homologie zu Glukagon wurde dieses zweite Inkretin nach Charakterisierung *Glucagon-like Peptide-1* genannt (Kreymann *et al.*, 1987; Mojsov *et al.*, 1987).

Auch andere gastrointestinale Hormone wie Sekretin oder Cholezystokinin können eine Insulinsekretion stimulieren, aber nur GIP und GLP-1 machen dies glukoseabhängig und bei Glukosespiegeln, die postprandial physiologisch auch vorkommen, so dass bisher nur diese beiden Stoffe die Definition eines Inkretins erfüllen (Ranganath, 2008a, b).

III.3.1. Metabolismus und Wirkung der Inkretine

GIP wird überwiegend in K-Zellen in der Schleimhaut des proximalen Dünndarms exprimiert (Feri *et al.*, 1983; Yeung *et al.*, 1999), während GLP-1 in L-Zellen des Dünndarms produziert wird (Reimann *et al.*, 2008). Die Sekretion wird durch Kohlenhydrate, Proteine und Fett in der Nahrung stimuliert, wobei wegen der Glukoseabhängigkeit nur Kohlenhydrate zu der Insulinantwort führen (Morgan *et al.*, 1988). Ungefähr 15 Minuten nach der Nahrungsaufnahme wird der Maximalspiegel und nach einer halben Stunden wieder basale Werte erreicht. Die Halbwertszeit ist mit 3-5 min sehr kurz, da das Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) GIP und GLP-1 hydrolysiert und damit inak-

tiviert (Deacon *et al.*, 1995). Der Hauptwirkort der Inkretine ist das endogene Pankreas, da dort die postprandiale Insulinantwort ausgelöst wird (Lewis *et al.*, 2000). Aber auch die Synthese von Insulin und die Proliferation der Betazellen wird vermittelt bei gleichzeitiger Hemmung der Betazellapoptose (Perfetti *et al.*, 2000; Drucker, 2003; Wideman und Kieffer, 2004). Mittels Rezeptoren im Pylorussphinkter wird die Magenentleerung nach der Nahrungsaufnahme verzögert, was zum einen postprandiale Hyperglykämiespitzen vermeidet und zum anderen durch eine erhöhte Distension des Magens ein Sättigungssignal auslöst (Naslund *et al.*, 1999). Die Vermittlung des Sättigungsgefühls wird ebenfalls dadurch ermöglicht, dass Inkretinrezeptoren im Gehirn vorhanden sind (Lui *et al.*, 1990; Usdin *et al.*, 1993). GLP-1 nimmt durch Rezeptoren im Hypothalamus Einfluss auf die Sekretion des orexigen wirkenden Neuropeptid Y, GIP scheint jedoch zentral die Nahrungsaufnahme zu fördern und zeigt damit nach bisherigen Erkenntnissen einen gegenteiligen Effekt. GLP-1-Rezeptoren konnten des Weiteren in Lunge und Herz gefunden werden, die Relevanz ist jedoch noch unklar (Richter *et al.*, 1991; Sokos *et al.*, 2006). Auch im Knochenmetabolismus spielen Inkretine eine Rolle, für GIP konnte z.B. ein anaboler Effekt nachgewiesen werden (Xie *et al.*, 2005; Tsukiyama *et al.*, 2006).

Besonders wichtig für den Kontext des metabolischen Syndroms ist die Wirkung der Inkretine auf das Fettgewebe, obwohl hier noch keine abschließende Klarheit herrscht. Für GLP-1 wurde eine insulinabhängige Steigerung der Fettsäuresynthese gezeigt (Oben *et al.*, 1991), aber auch, dass die Lipolyse stimuliert wird (Ruiz-Grande *et al.*, 1992). Auch der Rezeptor für GIP ist auf Adipozyten funktionsfähig vorhanden (Yip *et al.*, 1998) und stimuliert die Lipogenese (Morgan, 1996); ein lipolytischer Effekt wurde ebenfalls beschrieben (McIntosh *et al.*, 1999).

Trotz dieser kontroversen Daten wird davon ausgegangen, dass *in vivo* die Lipogenese die führende Rolle spielt, da GIP den Plasma-Triglyceridspiegel senkt (Ebert *et al.*, 1991) und über die Stimulation von Insulin die Lipogenese induziert wird. Die Bedeutung dieser gegenteiligen Effekte ist ungeklärt, lässt jedoch die Hypothese zu, dass GIP unterschiedliche Effekte im nüchternen und postprandialen Zustand haben könnte (McIntosh *et al.*, 2009). Die lipolytischen Effekte von GIP werden durch gleichzeitig stimuliertes Insulin wieder aufgehoben (McIntosh *et al.*, 1999), so dass im nüchternen Zustand ein gleichmäßiger Fettsäurespiegel durch GIP ermöglicht würde. Eine weitere Erklärung ist, dass die freien Fettsäuren selbst wieder verestert werden und dadurch eine Lipogenese begünstigen (Getty-Kaushik *et al.*, 2006). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass GIP die Aktivität der Lipoproteinlipase in Adipozyten steigert und damit die Fettspeicherung fördert, was für GLP-1 bisher nicht gezeigt werden konnte (Eckel *et al.*, 1979; Knapper und MORGAN, 1995; Miyawaki *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007). Weitere anabole Effekte sind Aktivierung der Proteinkinase B, Erhöhung der Menge des membranständigen Glukosetransporter 4 (GLUT 4) und zelluläre Aufnahme von Glukose (Song *et al.*, 2007).

III.3.2. Inkretin-basierte Therapie

Eine sechswöchige GLP-1-Therapie bei Typ 2 Diabetikern ermöglicht eine Verbesserung der Glukosekontrolle, was durch Bestimmung von Hämoglobin A_{1c} gezeigt werden konnte (Zander *et al.*, 2002). Gleichzeitig wurde eine Verbesserung der Betazellfunktion, Verzögerung der Magenentleerung, Minderung des Appetits und eine Reduktion des Körpergewichts und des Spiegels an freien Fettsäuren registriert.

Inzwischen sind GLP-1-Analoga wie Exenatid und Liraglutid und DPP IV-Inhibitoren wie Sitagliptin und Vildagliptin als Therapeutika verfügbar und zeigen den Beginn des Einzugs Inkretin-basierter Therapien gegen Typ 2 Diabetes mellitus (Lovshin und Drucker, 2009).

GIP hat bisher noch nicht den Weg in das wachsende Repertoire der Inkretinmimetika geschafft, da GIP bei Typ 2 Diabetikern nicht mehr wie bei gesunden Kontrollprobanden einen insulinstimulierenden Effekt zu haben scheint und somit als möglicher Therapieansatz lange Zeit nicht in Betracht gezogen wurde (Amland *et al.*, 1985; Meier *et al.*, 2004; Nauck *et al.*, 2004; Nauck, 2009).

III.3.3. GIP und Adipositas

Die Annahme einer GIP-Resistenz bei Diabetikern wird aber zunehmend überdacht und die bedeutende Rolle von GIP bei der Entwicklung von Diabetes und Adipositas betont (Meier *et al.*, 2002; Song und Wolfe, 2007; Flatt, 2008). Chronische Überernährung, v.a. mit Fett, erhöht den GIP-Gehalt der Dünndarmschleimhaut und den GIP-Spiegel im Blut (Higashimoto *et al.*, 1995). Des Weiteren haben Untersuchungen mit ob/ob-Mäusen, welche ein bewährtes Adipositas-Modell darstellen (Lindstrom, 2007), zeigen können, dass eine fettreiche Mast (*high fat diet*) den Plasma-GIP-Spiegel erhöht und zu einer Hyperplasie der GIP-produzierenden K-Zellen führt (Creutzfeldt *et al.*, 1978; Bailey *et al.*, 1986). Diese Entdeckungen und die überwiegende lipogenetische Wirkung machen GIP zu einem wichtigen pathogenetischen Faktor von Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus.

Erste Untersuchungen zeigen, dass ein GIPR-*Knock-Out* oder der kurzfristige Rezeptor-Antagonismus mittels Pro³GIP die Insulinsekretion und die Glukosehomeostase beeinträchtigen, was gut in den Kontext der insulinotropen Funktion des GIP passt. Die Verhinderung der Signalvermittlung über den GIPR führt zu erhöhten nüchternen und postprandialen Blutglukosewerten bei gleichbleibenden Insulinspiegeln (Miyawaki *et al.*, 1999; Irwin *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen an *Knock-Out*-Mäusen konnten jedoch zeigen, dass diese Mäuse bei einer *high fat diet* vor der Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz geschützt sind (Miyawaki *et al.*, 2002; Hansotia *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2008). Der *Knock-Out* bedingt ferner einen erniedrigten respiratorischen Quotienten und einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, was auf einen gesteigerten Energieverbrauch

und der bevorzugten Bereitstellung der Energiereserven aus dem Fettgewebe hinweist (Miyawaki *et al.*, 2002). Dazu passend bewirkt ein Rezeptor-Antagonismus eine Verbesserung metabolischer Parameter in der Leptin-defizienten ob/ob-Maus, wie beispielsweise Hämoglobin A_{1c}, Glukosesensitivität oder Insulinresistenz (Gault *et al.*, 2005; Irwin *et al.*, 2007). Außerdem führt der Antagonismus des GIPR zu einer Abnahme des Körpergewichtes und der Fettmasse in adipösen Mäusen nach einer *high fat diet* ohne Veränderung in der Nahrungsaufnahme (McClellan *et al.*, 2007), wobei diese Effekte über Insulinsignalwege vermittelt werden und somit funktionierende Betazellen voraussetzen (McClellan *et al.*, 2008).

Diese Ergebnisse verändern das Verständnis der GIP-Funktion, weg von der rein insulinstimulierenden Wirkung auf das Pankreas hin zu GIP als Bindeglied zwischen Überernährung und Adipositas mit allen Begleitpathologien. Man versteht GIP als Teil eines Circulus vitiosus: Erhöhte und übermäßig fetthaltige Ernährung führt zu einer Übersekretion von GIP, was zusammen mit einer folgenden Übersekretion von Insulin zu einer vermehrten Energiespeicherung im Fettgewebe führt. Die daraus entstehende Adipositas begünstigt ihrerseits die Entwicklung einer Insulinresistenz und damit vergesellschafteten Hyperinsulinämie, welche wiederum eine weitere Energiespeicherung in Adipozyten begünstigt (Miyawaki *et al.*, 2002; Yamada und Seino, 2004; Song und Wolfe, 2007; Flatt, 2008).

Neben den bereits zitierten Studien bekräftigen aber auch andere Ergebnisse die Bedeutung von GIP. Eine Antagonisierung des GIP-Signalweges durch einen Impfstoff scheint eine Therapieoption gegen Adipositas darzustellen (Fulurija *et al.*, 2008; Irwin *et al.*, 2008) und Untersuchungen von Patienten nach Magen-Bypass-Operation zeigen, dass die starke Gewichtsreduktion auf eine Beeinträchtigung der GIP-Signalvermittlung zurückzuführen sein kann (Flatt, 2007).

Zunehmend zeigt sich der GIP-Signalweg und insbesondere die Antagonisierung der Signaltansduktion als mögliche Option für eine Therapie von Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus. Eine abschließende Antwort auf die Frage nach der exakten Rolle von GIP und dem GIP-Signalweg in der Pathogenese des Metabolischen Syndroms steht noch aus. Erst dann wird auch GIP als Therapieziel Einzug in das Feld der Inkretin-basierten Therapeutika erhalten.

III.3.4. Voruntersuchungen

Arbeitsgruppen weltweit arbeiten daran, mithilfe von GIPR-*Knock-Out*-Zellen das Verständnis für GIP und seine exakte Rolle in dem Pathomechanismus des metabolischen Syndroms zu verbessern. Unter anderem hat die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Klein bereits einige Daten generieren können. Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über Daten, die die Grundlage der vorliegenden Promotionsarbeit bilden.

III.3.4.1. GIPR-*Knock-Out*-Zellen

Bei den GIPR-*Knock-Out* Zellen handelt es sich um Adipozyten aus gentechnisch veränderten Mäusen. Mithilfe eines Transfektionsmechanismus wurde das Gen für den GIP-Rezeptor geblockt; damit kann GIP nicht mehr an den spezifischen Rezeptor binden und die Wirkung des Inkretins bleibt aus. Auf dieser Basis wurde die adipozytäre Differenzierung an GIPR-*Knock-Out* Zellen der Maus untersucht und mit der Differenzierung von unveränderten Zellen, sogenannten Wildtypzellen, verglichen.

Dabei zeigte sich, dass die GIPR-*Knock-Out* Zellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen keinen fettspezifischen Farbstoff aufnehmen und somit keine bzw. eine defiziente Differenzierung durchlaufen (Abbildung 2). Diese ersten Ergebnisse legten einen Zusammenhang zwischen dem GIPR-*Knock-Out* und der adipozytären Differenzierung nahe. Möglich wäre eine direkte Beeinflussung durch GIP oder ein indirekter Zusammenhang. Insbesondere der Insulinsignalweg kam als Möglichkeit für einen indirekten Effekt in Frage.

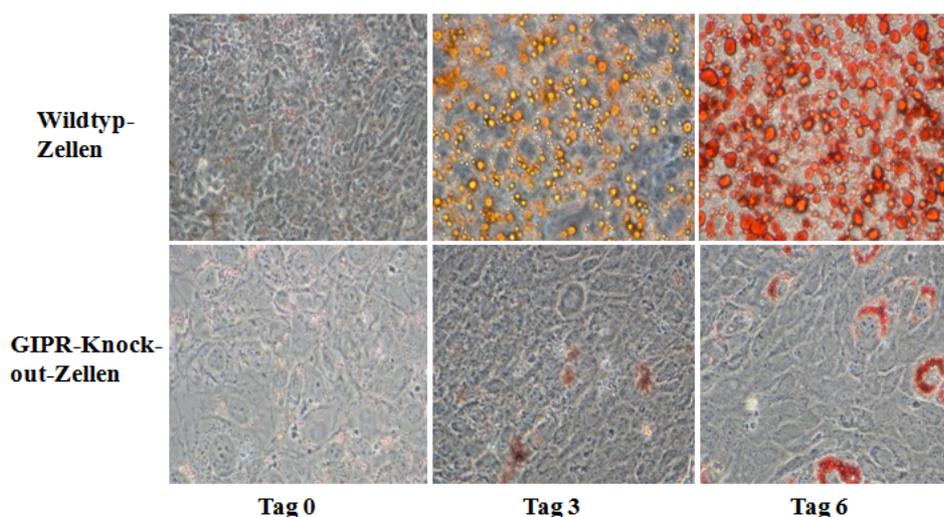


Abbildung 2: Fehlende Lipidakkumulation in GIPR-KO-Zellen. An den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung wurden GIPR-KO-Zellen und Wildtypzellen mit lipidspezifischer Oil Red O-Färbung behandelt und in 40facher Vergrößerung fotografiert.

Neben der Färbung als Beweis der nicht vorhandenen Adipogenese wurde auch die Expression verschiedener Differenzierungsmarker wie PPAR γ , Pref1 und IRS-1 mittels RT-PCR auf ihre Aktivität hin untersucht. Der intrazelluläre Transkriptionsfaktor PPAR γ steigt beispielsweise in den GIPR-*Knock-Out*-Zellen nicht wie bei Wildtypzellen an. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Konzentration von Pref1 während der Differenzierung nahezu konstant bleibt, während in WT-Zellen typischerweise eine Abnahme zu registrieren ist. Dazu kongruent sind Ergebnisse bei Unter-

suchung des Insulinsignalweges: Die Mengen des Insulinrezeptors und des Insulinrezeptorsubstrats IRS-1 stiegen in den Wildtypzellen an, in den *Knock-Out*-Zellen jedoch nicht, hier war eher ein Abwärtstrend zu erkennen.

III.3.4.2. GIPR-Reexpression in GIPR-*Knock-Out*-Zellen

Um einen direkten Effekt des GIPR-*Knock-Outs* auf das Differenzierungsdefizit der Zellen zu beweisen, wurde versucht, den GIP-Rezeptor in den GIPR-KO-Zellen zu reexprimieren.

Nach der Reexpression des GIPR in den KO-Zellen, wurde auch hier die adipozytäre Differenzierung untersucht.

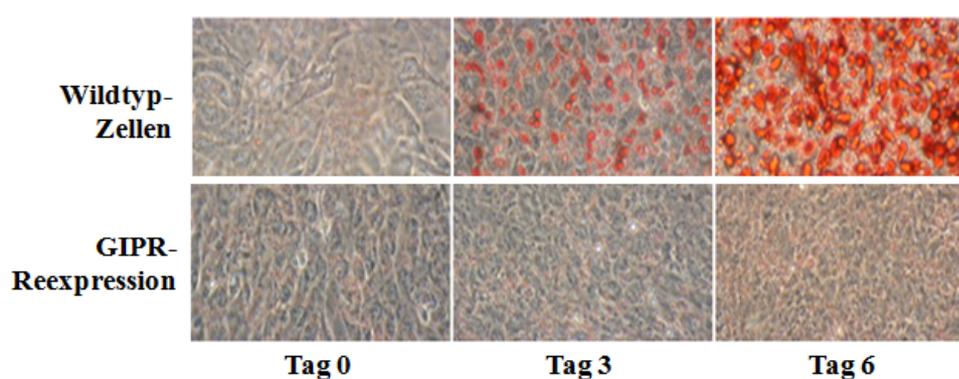


Abbildung 3: Fehlende Lipidakkumulation in GIPR-KI-Zellen. An den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung wurden GIPR-KI-Zellen und Wildtypzellen mit lipidspezifischer Oil Red O-Färbung behandelt und in 40facher Vergrößerung fotografiert.

Entgegen der Erwartung, dass die GIPR-KI-Zellen wieder wie Wildtypzellen Fett einlagern würden, zeigt sich in Abbildung 3 jedoch deutlich, dass bei diesen Zellen ebenfalls die Lipideinlagerung gestört ist. Auch hier tritt nach Erreichen der Konfluenz während der weiteren Differenzierung keine wesentliche makroskopische Veränderung der Zellen ein.

Die fehlende Fetteinlagerung der GIPR-KO-Zellen konnte durch die alleinige Reexpression des GIPR nicht aufgehoben werden, so dass auch bei den GIPR-KI-Zellen von einem bestehenden Differenzierungsdefizit ausgegangen werden muss. Jedoch stand hier der endgültige Nachweis der Rezeptoraktivität aus, so dass auch die Frage in die noch durchzuführenden Versuche aufgenommen wurde.

III.4. RNA Interferenz

Der Begriff „RNA Interferenz“ wurde erst 1998 eingeführt, als Fire und Mello entdeckten, dass das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Zellen des Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sehr effektiv die Expression des homologen Gens herabreguliert; viel effektiver noch als nur die Injektion des sense- oder antisense-Strangs (Fire *et al.*, 1998). Dieser Fund wurde als so herausragend und bedeutsam für die heutige Biowissenschaft gewertet, dass die beiden Hauptakteure im Jahr 2006 den Nobelpreis für Medizin verliehen bekamen, nur acht Jahre nach der erwähnten initialen Publikation. In der Tat nicht ganz ohne Kontroverse, da bereits vorher Jorgensen und Kollegen pigmentproduzierende Gene in Petunien eingeschleust hatten und anstatt der deutlichen Verstärkung der Farbe viele Pflanzen in weiß erhielten. Sie nannten dieses Phänomen Co-Suppression, da die Expression der eingeschleusten und des homologen Gens supprimiert war (Napoli *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1996). Ein weiterer Grund für die Kritik an der Verleihung des Nobelpreises an Fire und Mello war, dass die Grundlage ihrer Versuche Vorarbeiten von Guo und Kempheus waren (Guo und Kempheus, 1995). Aber Fire und Mello waren es, die maßgeblich zum Verständnis des bis dato unerklärlichen Phänomens beigetragen und dafür 2006 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

RNA Interferenz ist ein natürlich vorkommender intrazellulärer Signalweg, der höchst effizient und spezifisch die posttranskriptionale Inhibierung von Genexpression durch kleine dsRNA einleitet (Meister und Tuschl, 2004; Grimm, 2009). Dieser Vorgang stellt einen Protektionsmechanismus der Zelle gegen eine Invasion mobiler Gene dar, wie beispielsweise durch Viren oder Transposons (Hannon, 2002; Tijsterman *et al.*, 2002; Buchon und Vaury, 2006). Eine weitere Aufgabe ist die Regulation der Genexpression nach der Transkription als ein zellulärer Basisprozess (Fire *et al.*, 1998; Denli und Hannon, 2003). Nicht zuletzt ermöglicht das Phänomen der RNA Interferenz die Erforschung von Genfunktionen und stellt dadurch eine neue, aber inzwischen wesentliche, biomedizinische Methode dar (Hammond *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Dykxhoorn *et al.*, 2003; Schutze, 2004).

Neben dem Nutzen für ein besseres Verständnis vieler zellbiologischer Vorgänge und der Pathogenese vieler Erkrankungen, ist die RNA Interferenz auch *in vivo* eine vielversprechende Methode. Es gibt eine zunehmende Anzahl an Versuchen, die eine RNAi-medierte Therapie gegen immunologische, degenerative und maligne Erkrankungen ermöglichen sollen, wie beispielsweise Infektionen mit HIV oder Hepatitis, Tumoren wie Ovarialkarzinom oder Lungenkarzinom, Chorea Huntington oder die altersabhängige Makuladegeneration (Dallas und Vlassov, 2006; Pawitan, 2009). Es gibt bereits klinische Phase-I-Studien zur altersabhängigen Makuladegeneration (Nguyen *et al.*, 2009) und zur HIV-Therapie (von Eije und Berkhout, 2009).

III.4.1. Mechanismus der RNA Interferenz

In den Zellen vieler Organismen kommen dsRNA vor, die im Zellkern als sogenannte Primär-miRNA (primary micro-RNA, pri-miRNA) exprimiert werden und dann von einer Endonuklease (RNase III Drosha) in die kürzere Vorläufer-miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) zerteilt und mithilfe des Transportproteins Exportin-5 in das Zytoplasma verlagert werden (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Kim, 2004; Kim *et al.*, 2009). Im Zytoplasma werden durch das Enzym Dicer aus den pre-miRNA ca. 22 Nukleotide große miRNA mit charakteristischen Überhängen am 3'-Ende geschnitten (Bernstein *et al.*, 2001; Hutvagner und Zamore, 2002). Die miRNA wird auf ein Protein der Familie der Argonaute geladen, um den Effektor-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) zu bilden. Nur ein Strang, der auch als *guide strand* bezeichnet wird, verbleibt in dem Komplex, der andere Strang (*passenger strand*) wird abgebaut. Der RISC-Komplex erfüllt verschiedene Aufgaben: Die zum *guide strand* homologe mRNA wird aufgesucht und durch eine Helikase- und Endonuklease-Aktivität wird die Ziel-mRNA degradiert (Hammond *et al.*, 2001; Grimm, 2009; Kim *et al.*, 2009). Die Spezifität wird nur durch sieben Nukleotide gewährleistet, so dass eine miRNA eine Vielzahl von mRNA regulieren kann und eine mRNA durch eine Vielzahl von miRNA reguliert werden kann, was - obwohl noch ein kontroverses Thema - ein komplexes regulatorisches Netzwerk vermuten lässt (Grimm, 2009).

III.4.2. siRNA

Neben den miRNA gehören auch siRNA, was für *small interfering RNA* steht, zu den kleinen RNA und werden ebenso wie die miRNA im erläuterten Prozess in RISC-Komplexe gebunden und bauen spezifisch mRNA ab (Carthew und Sontheimer, 2009). Man spricht bei dieser Genexpressionshemmung auch von *Knock-down*. Beide werden aus dsRNA durch den Dicer produziert, wobei man den Dicer-1 für die Herstellung der miRNA und den Dicer-2 für siRNA unterscheiden muss (Lee *et al.*, 2004). SiRNA werden aus langen dsRNA prozessiert und sind nicht abhängig von einer Drosha-produzierten Vorstufe, außerdem sind sie mit einer Länge von ungefähr 21 Nukleotiden etwas kürzer und haben ein zwei Nukleotid langes 3'-Ende (Elbashir *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2009). Zuerst wurde angenommen, dass miRNA als endogene Regulatoren die Genexpression posttranskriptional regulieren und siRNA den Protektionsmechanismus gegen eine Invasion fremder Gene wahrnehmen, da sie von außen in die Zellen gelangen, beispielsweise als Teil eines Virus. Inzwischen unterscheidet man aber zwischen jenen exo-siRNA als Schutzinstanz und endo-siRNA als weitere Teilnehmer in dem komplexen Netzwerk der posttranskriptionalen Expressionsregulation. Das Wissen in diesem Bereich ist noch sehr neu und fast täglich kommen neue Entdeckungen hinzu, die das Feld vergrößern.

Die herausragende Bedeutung der siRNA für die Biomedizin ist nicht zuletzt darin begründet, dass es auch in Säugetierzellen möglich ist, diese nach chemischer Synthese zu nutzen, um spezifisch eine mRNA abzubauen (Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b). Um siRNA methodisch nutzen zu können, müssen diese in die Zellen gelangen, man spricht dabei von Transfektion. Zur Transfektion werden hauptsächlich Lösungen auf Lipidbasis (Felgner *et al.*, 1987; Hawley-Nelson *et al.*, 2008) oder Elektroporation (Gresch *et al.*, 2004; Zaragosi *et al.*, 2007) verwendet. Werden siRNA verwendet, handelt es sich um einen transienten, also zeitlich begrenzten Ansatz. Im Durchschnitt kann von einer Aktivität ausgegangen werden, die drei bis fünf Tage anhält (McManus und Sharp, 2002).

III.4.3. shRNA

Einen anderen Ansatz verfolgt die Verwendung von *short hairpin RNA*. Hierbei handelt es sich um einen stabilen Ansatz, der es ermöglicht, die Expression eines Gens dauerhaft zu hemmen (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002a) und dadurch eine *Knock-down*-Zelllinie zu erstellen (Paddison *et al.*, 2002b). Hierbei sind zwei komplementäre Stränge, die für die Ziel-mRNA spezifisch sind, miteinander über eine kleine Haarnadelstruktur verbunden (Grimm und Kay, 2007). Die shRNA sind in einen viralen Expressionsvektor verpackt und gelangen nach Aufnahme in das Zytoplasma der Zielzellen durch einen weiteren Transport in den Nukleus. Dort werden sie mittels Transkription in den natürlichen RNAi-Mechanismus eingeschleust. Auf diese Weise werden sie nach Bearbeitung durch Drosha ebenfalls mit Exportin-5 zurück in das Zytoplasma transportiert und als siRNA in RISC eingebaut und können auf diese Weise einen *Knock-down* erzielen (Rao *et al.*, 2009).

III.4.4. Keine Wirkung ohne Nebenwirkung

In Zellen höherer Organismen wie Säugetierzellen induziert das Einbringen von langer doppelsträngiger RNA (über 30 Basenpaaran) eine unspezifische Inhibition der Translation durch Aktivierung des Interferonsystems. Es wurde gezeigt, dass auch siRNA eine solche Antwort durch Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und durch erhöhte Expression Interferon-regulierter Gene verursachen können (Sledz *et al.*, 2003; Pebernard und Iggo, 2004; Sledz und Williams, 2004). Es wird aber auf der anderen Seite davon ausgegangen, dass diese unspezifische Abwehr keine Rolle bei der Verwendung von siRNA und shRNA spielt, da mit einer geringen Konzentration bereits erfolgreiche Expressionshemmungen zu erreichen ist ohne Aktivierung einer Interferonantwort (Dallas und Vlasov, 2006). Zellfremde RNA kann jedoch auch Proteinkinasen aktivieren, die einen inhibitorischen Einfluss auf die Translation haben; dies scheint allerdings - wahrscheinlich wegen der geringen Größe - nicht durch siRNA hervorgerufen zu werden (Caplen *et al.*, 2001;

Elbashir *et al.*, 2001a; Vickers *et al.*, 2003). Berichtet wurde auch von unspezifischen Effekten auf Proteinebene, die abhängig von der Struktur der verwendeten siRNA sind (Scacheri *et al.*, 2004); das ist allerdings noch nicht komplett verstanden. Fazit ist sicherlich, dass siRNA anders als Antisense-Oligonukleotide weniger bis keine sogenannten *off-target*-Effekte hat, was wiederum von Faktoren wie Konzentration und Struktur der siRNA abhängt.

III.5. Fragestellung

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit ist:

Hat der GIPR einen direkten Effekt auf Lipidakkumulation und Differenzierung kultivierter Adipozyten?

Bearbeitet wurde die Fragestellung durch folgende Versuchsansätze:

- 1) Validierung des GIPR-*Knock-Out* in den verwendeten Zelllinien.
- 2) Validierung der GIPR-Reexpression in den GIPR-KI-Zelllinien.
- 3) Bestimmung des GIPR-Expressionsprofils in Wildtypzellen während der Adipogenese.
- 4) Blockade des GIPR-Signalweges mithilfe der RNA Interferenz (transient vs. stabil).

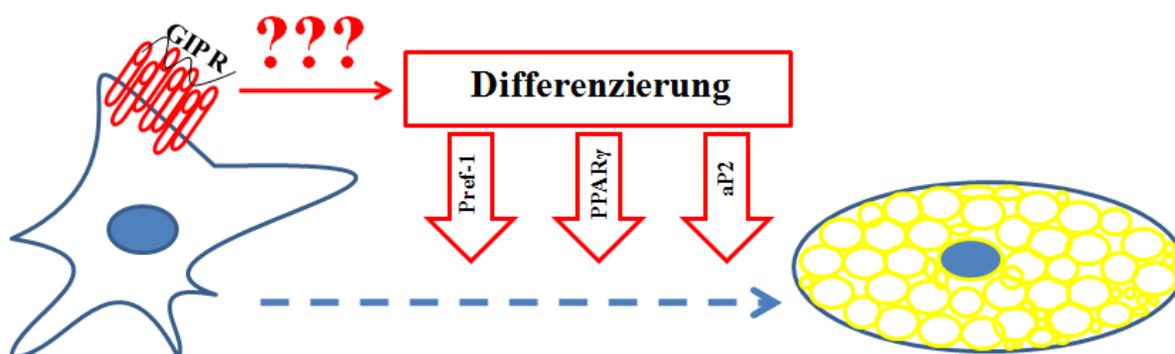


Abbildung 4: schematische Darstellung der Fragestellung.

IV. MATERIAL UND METHODEN

IV.1. Material

IV.1.1. Verwendete Geräte

Agarosegelkammer	Paqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Roth, Karlsruhe
Autoklaviergeräte	2540EI Systec, Wettengel Varioklav, H+P, Oberschleißheim
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Digitalkamera	Olympus, Hamburg
Eismaschine	Scotsman AF-20, Enodis, Herborn
Elektronikrührer Typ M23	Int. Laborat. App., Dottingen
elektronische Pipettierhilfe	accu-jet, Brand, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop	CKX 42, Olympus, Hamburg
Fotokamera	Mp-4, Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Gelkammern (Agarose)	Peqlab, Erlangen
Heizblöcke Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Heizschrank	Lab-Therm, B. Braun, Melsungen
Inkubator Typ B5060, EK CO ₂	Heraeus, Osterode
Eppendorf Mastercycle realplex ² SGradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	CK2, Olympus, Hamburg
Mikrowellengerät	S2719N, Samsung, Schwalbach/Ts.
Multistepper	Multipette plus, Eppendorf, Hamburg
Netzgeräte	Power Pac 300, BioRad, München Power Supply 600, Pharmacia BioTeck, SF, USA
Nucleofector®-Apparat	Amxa Biosystems, Lonza Cologne AG

pH-Meter	766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research, Eppendorf, Hamburg
Real Time Thermocycler	Applied Biosystems, FC, CA, USA Realplex, Eppendorf, Hamburg
Rotator	Renner GmbH, Darmstadt
Scanner	UMAX, Astra 2200
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schwenker	Hassa, Lübeck
Sequenziermaschine, ABI 3139 genetic analyzer	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Stickstofftank	Arpege 110, VWR International GmbH, Darmstadt
Thermocycler	Cyclone Gradient, Peqlab, Erlangen
UV-Leuchttisch	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Wasserbad	Typ 3044, Köttermann, Hänigsen
Werkbank (steril) Nuair Class II	Zapf Instruments, Sarstedt
Zentrifugen	Biofuge fresco, Rotor 3765, Heraeus, Osterode Minispin plus, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3 S-R, Heraeus, Osterode Sorvall Ultrazentrifuge, DuPont, Bad Homburg

IV.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einmal-Küvetten für RNA-Photometrie	Mikroküvetten Uvette, Eppendorf, Hamburg
Einmal-Küvetten für Amaxa Nucleofector	Amaxa Biosystems, Lonza Cologne AG, Germany
Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Film	Hyperfilm, Amersham Biosciences, UK
Filter	Streritop Express plus, 0,22 µm, Millipore Cor-

	poration, USA
Latex-Handschuhe Peha-Soft	Paul Hartmann AG
Nitra-Tex Handschuhe	Ansell, UK
Parafilm M	American National Can., St. Louis, MO,USA
<u>Pipettenspitzen:</u>	
- Biosphere Filter Tips (10, 100, 200, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht
- Stabpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Serological Pipette, Sarstedt, Nümbrecht
<u>Reaktionsgefäße:</u>	
- PCR Softtubes 0,5 ml	Biozym, Scientific GmbH, Deutschland
- RNase-free 1,5 ml Microfuge Tubes	Ambion Inc. Austin TX; USA
- Safe-lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
- 96-Well	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
<u>Zellkulturschalen:</u>	
- Tissue culture dish (100/150 x 20 mm)	Sarstedt, USA
- 6-Well-Platten	greiner bio one

IV.1.3. Chemikalien nach Hersteller

Fa. Amaxa Biosystems, Lonza Cologne AG, Germany

Nucleofector®-Solution

Fa. Ambion Inc. Austin TX, USA

Anti-RNase

RT PCR Grade Water

DNA-free-Kit:

- 10fach DNase I Buffer
- rDNase

- Inactivation Buffer

Applied Biosystems

TagMan Gene Expression Assay Mm01316351_g1

TaqMan Universal PCR Master Mix

Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Germany:

DTT (1,4-Dithiothreitol)

Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/l)

Trizol

Trypsin-EDTA

Superscript II Reverse Transcriptase

Ready-Load 100bp DNA Ladder

Lipofectamine™ 2000-Reagenz

LB-Agar

Fa. Merck, Darmstadt, Germany:

Chloroform

Ethanol

Isopropanol

Fa. Qiagen, Hilden, Germany:

Quiazol-Reagenz

Mm_Gipr_1_HP siRNA

- Sense: CGU AAU UAC AUU CAC AUG A
- Antisense: UCA UGU GAA UGU AAU UAC G

Mm_Gipr_2_HP siRNA

- Sense: CCU GCG UCU CAG UCU UCA A
- Antisense: UUG AAG ACU GAG ACG CAG G

Mm_Gipr_3_HP siRNA

- Sense: CAG AGG ACU UUA UAU AAU A
- Antisense: UAU UAU AUA AAG UCC UCU G

AllStars Neg. Control siRNA (Sequenz proprietär)

siRNA Suspension Buffer

Fa. Roche, Mannheim, Germany:

Ethidiumbromid

DNA Molecular Weight MarkerX

Fa. Sigma, Deisenhofen, Germany:

2-Propanol

Dexamethason

EDTA

fetales Kälberserum

Formalin

Indomethazin

Isobutylmethylxanthin (IBMX)

Isopropanol

Oil Red O

T3 (3,3'-5-Triiod-L-Thyronin-Natriumsalz)

bovines Insulin

Puromycin

Fa. Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany

TAQ DNA Polymerase

10x PCR Puffer

andere Hersteller:

Agarose (Applichem, Darmstadt)

aqua dest. aus eigener Destillieranlage

DEPC (Fluka, Steinheim, CH)

dNTPs (Fermentas, St.Leon Roth)

Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)

bovines Insulin (Boehringer, Mannheim)

Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Österreich)

SYBR Green Mix (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)

IV.1.4. Kulturmedien und Puffer**IV.1.4.1. Grundmedium**

DMEM	4,5 g/l (Glukose)
fötales Rinderserum (FBS)	20%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

IV.1.4.2. Differenzierungsmedium

DMEM	4,5 g/l (Glukose)
fötales Rinderserum (FBS)	20%
Insulin	20 nM
Trijodthyronin (T3)	1 nM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

IV.1.4.3. Induktionsmedium

DMEM	4,5 g/l (Glukose)
fötales Rinderserum (FBS)	20%
Insulin	20 nM
Trijodthyronin (T3)	1 nM
Indomethacin	50 µM
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	100 µM
Dexamethason	2 mg/ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

IV.1.4.4. PBS

(pH 7,4)

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
H ₂ KO ₄ P	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	1,44 g/l

IV.1.4.5. Puffer für die Agarosegelelektrophorese**TBE-Puffer**

Tris	890 mM
------	--------

Borsäure	890 mM
EDTA	2 mM
Auftragspuffer	
Glycerin	50% (w/v)
SDS	0,2% (w/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

(in einfach TBE)

DEPC-Wasser

DEPC 1:1000 in Aqua dest. verdünnen

wenigstens 30 min rühren

über Nacht bei 37°C, dann autoklavieren

IV.1.5. Oil Red O Färbung

Stocklösung

Oil Red O (0,5 g) in 100 ml Isopropanol

Gebrauchslösung

60% Oil Red O-Stocklösung

40% aqua dest.

Filtern durch Whatman # 1 Filterpapier (ohne Vakuum)

IV.1.6. Weiteres Material für RNA Interferenz

IV.1.6.1. shRNA, Synthese von der Fa. Operon

shGIPR1

Sense: CGT AAT TAC ATT CAC ATG A

Antisense: TCA TGT GAA TGT AAT TAC G

shGIPR3

Sense: CAG AGG ACT TTA TAT AAT A

Antisense: TAT TAT ATA AAG TCC TCT G

shGIPR4

Sense: CTG GAA GGC AAT TGG GAT A

Antisense: CTG GAA GGC AAT TGG GAT A

shGIPR6

Sense: AGT GAT GGC CAG TGG GGA T

Antisense: AGT GAT GGC CAG TGG GGA T

sh.contr1

Sense: TAG CGA CTA AAC ACA TCA A

Antisense: ATC GCT GAT TTG TGT AGT T

IV.1.6.2. Erstellung der *Knock-down*-Zelllinien

pSIREN-RetroQ-Neo®	Clontech pSIREN-RetroQ durch D Hadaschik modifiziert (PuroR Gen ausgetauscht gegen NeoR Gen)
T4-Puffer	New England Biolabs
T4-Ligase	
pLXSN-EGFP	Vektor von Clontech, Konstrukt von D. Hadaschik erhalten
shLUC	von Dr. D. Hadaschik erhalten
α -Select-E.coli	New England Biolabs
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilgen, Germany
- Puffer P1, P2, N3, PB	
- Miniprep-Säule	
pSIREN Forward Primer	von Dr. D. Hadaschik erhalten
NEB2-Puffer	New England Biolabs
XhoRI	
Bosc-23-Zellen	von Dr. D. Hadaschik erhalten
Fugene 6	Roche
OptiMEM	Invitrogen
Polybrene	von Dr. D. Hadaschik erhalten

IV.1.7. PCR

IV.1.7.1. Enzyme und Puffer

Taq DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SuperScriptII RNase H ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-RNase	Ambion Inc. Austin TX, USA
dNTPs	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SYBR Green Mix	TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan
RT-PCR Grade Water	Ambion Inc., Austin TX, USA

Die Reaktionspuffer für alle Polymerasen wurden entsprechend der Herstellerempfehlung verwendet und vom jeweiligen Hersteller bezogen.

IV.1.7.2. Primer

(Die verwendeten Primer wurden mithilfe des Programmes Primer Express der Firma Applied Biosystems gestaltet. Die ermittelte Primersequenz wurde von der Firma Biometra, Göttingen synthetisiert)

36B4	For: AAG CGC GTC CTG GCA TTG TCT Rev: CCG CAG GGG CAG CAGTGG T
LX1	For.: GTG TCT TGC CCC TGG TAT CTG Rev.: TGG CCA TCA CTG CCA CAC T
rGIPR	For.: GGAAAAAGCCAGGGCCTG Rev.: GACTTTTGATTGCTCTCCTTTTGTCT
MC4R	For.: GTG AGC GTT TCG AAT GGG TC Rev.: GGC CCA GCA GAC AAC AAA GA
PPAR γ	For: TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC Rev: AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT
aP2	For: CAA AAT GTG TGA TGC CTT TGT G Rev: CTC TTC CTT TGG CTC ATG CC
PrefI	For: TCT GCG AGG CTG ACA ATG TC Rev: CAG ATG CAC TGCCAT GGT TC

IV.2. Methoden

IV.2.1. Zellmodel

Es wurden weiße Adipozyten verwendet, die entweder aus einem epididymalen oder inguinalen Fettdepot einer neugeborenen Wildtyp-Maus gewonnen wurden. Während der anschließenden Kultivierung der isolierten Fettzellen wurden die Präadipozyten mit dem retroviralen pBabe-Vektor infiziert. Dieser enthielt neben einer Gensequenz für eine Puromycin-Resistenz auch eine für das SV-40-T-Antigen (pBABE-puro SV40 LT). Durch Zugabe von Puromycin in das Zellmedium konnten die durch SV40 LT immortalisierten Zellen selektiert werden. Die erfolgreich immortalisierten Zellen konnten durch Einfrieren in Flüssigstickstoff konserviert und für spätere Experimente verwendet werden. Das System zur Erstellung dieser Fettzelllinie ist durch die Arbeitsgruppe etabliert (Klein *et al.*, 1999; Perwitz, 2008).

IV.2.2. Zellkultur

Die Arbeit mit den Zellkulturen wurde an einer Sterilbank in keimarmer Umgebung durchgeführt; die verwendeten Kulturmedien und Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert und in einem Wärmebad auf 37° C angewärmt. Die Präadipozyten wurden auf einer 15 cm großen Kulturschale in Grundmedium kultiviert und bei einer Umgebung von 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Sauerstoff bei 37°C aufbewahrt. Sobald nach zwei bis drei Tagen eine Konfluenz von 70 bis 80% erreicht war, konnten die Zellen für weitere Untersuchungen verwendet werden. Da die Zellen adhären in der Kulturschale wachsen, wurden sie nach einem Waschvorgang mit PBS durch Zugabe von 2,5 ml Trypsin abgelöst. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37° C konnten die Zellen in 30,5 ml Grundmedium aufgenommen und suspendiert werden. Für die Durchführung von Versuchen konnte diese Zellsuspension auf Kulturschalen verteilt werden; für die RNA Interferenz-Experimente wurden Sechsllochplatten und für die Arbeit mit ausdifferenzierten Wildtyp-Adipozyten 10 cm große Zellkulturplatten verwendet. Nach Aussaat der Zellen wurde Differenzierungsmedium beigefügt. Bei jeder Zellpassage wurden jeweils circa 10% der Präadipozyten mit neuem Grundmedium zurück auf die Stammpalte gegeben, die auf diese Weise nach weiteren zwei bis drei Tagen erneut verwendet werden konnten. Zum Erhalt des Präadipozyten-Stadiums war es notwendig, dass die Zellen gut auf der Kulturplatte verteilt wurden und keine Zellkontakte entstehen konnten, die eine Zelldifferenzierung induzieren könnte.

Für die vorliegenden Experimente wurden Zellen der Passagen 12 bis 25 verwendet.

IV.2.3. Zelldifferenzierung

Zur Differenzierung wurden die ausgesäten Zellen bis zur vollständigen Konfluenz (ungefähr zwei bis drei Tage) in Differenzierungsmedium kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Differenzierung der Zellen durch Zugabe des Induktionsmediums mit IBMX, Dexamethason und Indomethacin induziert. Nach 20 bis 24 Stunden wurde die Inkubation durch Mediumwechsel beendet und anschließend täglich das Medium durch neues Differenzierungsmedium ersetzt bis das gewünschte Differenzierungsstadium erreicht war. Die Inkubation mit dem Induktionsmedium bewirkt einen Proliferationsstopp und induziert die vermehrte Lipidakkumulation.

Der Zeitpunkt des Mediumwechsels von Induktions- zu Differenzierungsmedium wird im Folgenden als Tag 0 bezeichnet. Zum Erreichen einer vollständigen Differenzierung wurden die Zellen bis Tag 6 kultiviert; während der Differenzierung wurde die Fetteinlagerung sowohl makroskopisch durch Beurteilung des sich bildenden Fettfilms als auch mikroskopisch durch Beurteilung der Akkumulation der intrazellulären Lipidvakuolen verfolgt. In der Regel wurden die Tage 0, 3 und 6 als Differenzierungspunkte für die Versuche gewählt.

Dieses Differenzierungsprotokoll wurde sowohl für die Wildtypzellen als auch für die GIPR-KO-Zellen, die GIPR-KI-Zellen und die shRNA-Zelllinien angewendet.

IV.2.4. Oil Red O-Färbung

Um die Fetteinlagerung darzustellen, wurde die Oil Red O-Färbelösung verwendet, mit der Lipide spezifisch angefärbt werden können. Dafür wurden die Zellen in den Kulturschalen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für wenigstens 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 10%igem Formaldehyd inkubiert und dadurch fixiert. Daraufhin mussten die Zellen für mindestens eine Stunde mit der Färbelösung (Gebrauchslösung) inkubiert werden. Für die 10 cm großen Zellkulturschalen wurden 5 ml verwendet, für Sechsllochplatten 2,5 ml. Bevor Fotoaufnahmen gemacht wurden, musste die Färbelösung entfernt werden, indem mehrere Waschvorgänge mit destilliertem Wasser durchgeführt wurden.

Die im Folgenden gezeigten Bilder stellen mit Oil Red O gefärbte Wildtyp Adipozyten während der Differenzierung dar:

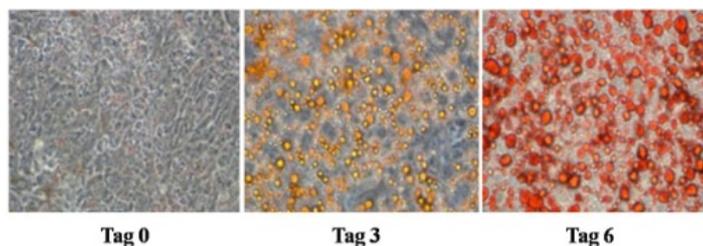


Abbildung 5: Mikroskopie von Oil Red O-Färbung differenzierender Wildtypzellen. In 10cm-Schalen differenzierende Wildtypzellen wurden an Tag 0, 3 und 6 mit dem Oil Red O-Reagenz angefärbt.

Deutlich kann man die zunehmende Färbung erkennen, die dem vermehrten Lipidgehalt der Zellen entspricht. Zur Dokumentation wurden die Zellen nach Färbung unter einem Mikroskop in 10facher, 20facher und 40facher Vergrößerung fotografiert; Sechslachplatten wurden eingescannt. Anschließend konnte eine densitometrische Auswertung durchgeführt werden. Dazu musste der Farbstoff mit Isopropanol (Menge analog zum Gebrauchsmedium) aus den Zellen gewaschen werden. Nach 30 min Inkubationszeit wurde für jede Probe jeweils zweimal 1 ml der so entstandenen Lösung in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 500 nm im Photometer bestimmt. Von den Doppelwerten wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und für weitere Analysen verwendet.

IV.2.5. RNA Interferenz

RNA Interferenz beschreibt als Oberbegriff die Beeinflussung der Expression einzelner Gene, die natürlicherweise in eukaryotischen Zellen vorkommt oder als biomedizinische Labormethode zur Untersuchung der Genfunktionen verwendet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden siRNA und shRNA verwendet.

IV.2.5.1. Transienter *Knock-down*

Das Einbringen von siRNA Molekülen in die Zellen wird auch Transfektion genannt und sollte für die Zelle möglichst schonend verlaufen. Es stehen verschiedene Transfektionstechniken zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden zwei kommerzielle Techniken verwendet, zum einen das Amaxa® Nucleofector®-Kit und zum anderen das Lipofectamine™ 2000-Reagenz von Invitrogen.

IV.2.5.1.1. siRNA

Es wurden die siRNA1, siRNA2 und siRNA3 verwendet, die von der Firma Qiagen für die Inhibition der GIPR-Expression angeboten wurden. Als Negativkontrolle wurde die Allstar-Negative-Control-siRNA (auch scrambled-siRNA oder abgekürzt neg. siRNA) von Qiagen benutzt. Die Negativkontrolle hat laut Herstellerangaben eine Sequenz, die zu keinem bekannten Säugetiergen homolog ist und somit keinen *Knock-down* erzielt bei gleichzeitig minimalen Nebeneffekten. Die siRNA wurden gefriergetrocknet in 5 nmol-Aliquots (die Negativkontrolle in 20 nmol-Aliquots) geliefert und zunächst in dem mitgelieferten „Suspension Buffer“ (250 µl bei 5 nmol, 1000 µl bei 20 nmol) aufgenommen und gelöst, um eine 20 µM Lösung zu erhalten. Anschließend wurden die Gefäße 1 min bei 90 °C und 60 min bei 37 °C inkubiert, um beide siRNA Stränge zu hybridisieren. Danach wurden die doppelsträngigen siRNA entweder bei -20 °C eingefroren oder für Experimente verwendet; dabei wurden die siRNA auf Eis gelagert, um eine RNA-Degradation zu minimieren.

IV.2.5.1.2. Amaxa® Nucleofector®

Mit dem Amaxa® Nucleofector®-Apparat werden Zellen elektroporiert, d.h. durch Anlegung einer kurzen Spannung öffnen sich in der Zellmembran Kanäle, durch die z.B. die siRNA in die Zellen gelangen. Dieser Vorgang erfolgt in einer spezifischen Pufferlösung (Zaragosi *et al.*, 2007), die in dem Amaxa® Nucleofector®-Kit enthalten ist. Für die Elektroporation werden einzelne Küvetten mit der jeweils vollständigen Zellsuspension befüllt und in den Nucleofector eingesetzt. Es ist möglich, je nach Zelltyp und Differenzierungsstadium vorprogrammierte Geräteeinstellungen zu wählen, die die besten Transfektionsergebnisse liefern. Für die in dieser Arbeit transfizierten Präadipozyten wurde das Programm T30 gewählt, das auch für 3T3-L1-Präadipozyten und vergleichbare Zelllinien geeignet ist.

Die Zellen wurden nach Aussaat für zwei Tage in Sechslochplatten kultiviert. Zur Testdurchführung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit auf 37 °C vorgewärmten PBS gewaschen. Mit 250 µl Trypsin wurden die Zellen von dem Plattenboden gelöst und in 1 ml ebenfalls vorgewärmten Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde danach in ein Röhrchen überführt und für 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in warmen PBS aufgenommen und die Zellen durch Suspensieren verteilt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in bereits vorbereiteter Lösung aus Nucleofector®-Solution und siRNA aufgenommen, resuspendiert, in eine Küvette und in den Nucleofector®-Apparat zur Transfektion überführt. Die siRNA lag in einer 20 mM Lösung vor, so dass 5 µl siRNA-Lösung 100 pmol siRNA ergaben bzw. 10 µl 200 pmol. Von der Nucleofector®-Solution wurden jeweils 100 µl gebraucht. Nach Durchführung der Elektroporation wurde die Zellsuspension in eine neue Sechslochplatte pipettiert und mit 1 ml Differenzierungsmedium aufgefüllt. Dabei wurde durch

Schwenken der Kulturplatten eine optimale Zellverteilung erzielt. Nach der Durchführung wurden die Zellen wie beschrieben differenziert. Je nach Dichte des Zellrasens konnte die Induktion entweder einen oder zwei Tage nach Transfektion vorgenommen werden.

IV.2.5.1.3. Lipofectamine™ 2000-Reagenz

Das Lipofectamine™ 2000-Reagenz bietet die Möglichkeit, adhärente Zellen ohne Lösen von den Kulturplatten zu transfizieren. Das Reagenz enthält dafür positiv geladene, kationische Lipide (Felgner *et al.*, 1987). Durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Oligonukleotid-Rückgrat der siRNA entstehen kompakte, positiv geladene, lipidische Transportvesikel, die die hydrophobe, negativ geladene Zellmembran der Zielzellen überwinden können (Hawley-Nelson *et al.*, 2008).

Zunächst wurden 5 µl Lipofectamine™ 2000-Reagenz in 125 µl DMEM pipettiert, beides vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In weitere 125 µl DMEM wurde die gewünschte siRNA-Menge gemischt (5 µl 20 mM siRNA-Lösung für 100 pmol siRNA; 7,5 µl für 150 pmol; 10 µl für 200 pmol und 15 µl für 300 pmol; entweder wurden einzelne siRNA oder Pools aus mehreren siRNA verwendet.). Diese beiden Gemische wurden anschließend vermengt und für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde von den Zellen in den Sechsllochplatten das Medium abgesaugt und 750 µl warmes DMEM hinzugegeben. Nach abgeschlossener Inkubation der siRNA-DMEM-Lipofectamine™ 2000-Lösung wurde diese tropfenweise zu den Zellen pipettiert und durch Schwenken eine gute Verteilung erreicht. Die Inkubation wurde bei 37 °C und 5% CO₂ im Kulturschrank durchgeführt und nach sechs Stunden durch Einleitung der Induktion beendet.

IV.2.5.2. Stabiler *Knock-down*

Durch Verwendung von shRNA können stabile *Knock-down*-Zelllinien erstellt werden, in denen die Expression des Zielgens kontinuierlich unterbrochen wird.

IV.2.5.2.1. shRNA-Design

Um einen stabilen *Knock-down* zu erreichen, werden shRNA in Zellen exprimiert und *Knock-down*-Zelllinien erstellt. ShRNA sind siRNA-ähnliche RNA, die eine Haarnadelstruktur ausbilden (Paddison *et al.*, 2002a). Diese Struktur besteht aus einem doppelsträngigen Teil und einer Loop-Sequenz, die beide Enden miteinander verbindet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenz 5'-TTCAAGAGA-3' für den Loop verwendet, über den der 19 Nukleotide lange Sense-Strang mit dem ebenfalls 19 Nukleotide langen „reverse-complement“-Strang verbunden ist (Brummelkamp *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002). Exprimiert werden solche shRNA bevorzugt von RNA Polymerase III Promotoren, in diesem Fall ist es der U6-Promotor. Dafür wird die shRNA-Sequenz mit Hilfe von

zwei komplementären und hybridisierten Oligonukleotiden hinter den U6-Promoter in den Expressionsvektor kloniert. Als Stop-Signal für die RNA Polymerase III dient eine kurze Sequenz bestehend aus mindestens fünf bis sechs Thymidinen. Um die Oligonukleotide mit dem Vektor zu ligieren, besitzen die hybridisierten Enden der shRNA-Oligonukleotide 5'-Überhänge, die einer BamHI oder einer EcoRI Schnittstelle entsprechen. Außerdem wurde hinter der Stop-Sequenz eine XhoI Schnittstelle eingefügt, um nach der Ligation und Transformation solche Klone mittels Restriktionsspaltung zu identifizieren, die tatsächlich die shRNA-Oligonukleotide enthielten. Nur dann wird der Vektor, der selber schon eine Xho I-Schnittstelle besitzt, zweimal durch Xho I geschnitten und es entsteht ein ca 1,3 kb großes Fragment.

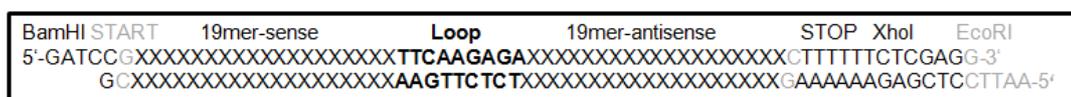


Abbildung 6: schematische Darstellung der hybridisierten Oligonukleotide, die in pSIRENQ-Neo kloniert wurden und eine short hairpin RNA kodieren.

In der Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) wurde die Sequenz der mRNA des GIPR recherchiert. Die verwendeten shRNA wurden mit dem siRNA Design Tool der Firma Dharmacon (Dharmacon), das die Ziel-mRNA nach möglichen siRNA-Bindungsstellen absucht und dabei verschiedene Designregeln einhält. Dazu gehört beispielsweise die höhere thermische Stabilität am 5'-Ende verglichen mit dem 3'-Ende des siRNA-Stranges (Schwarz *et al.*, 2003), einen Guanin-Cytosin-Gehalt zwischen 35 und 50% und weitere in der Literatur nachzulesende Regeln (Elbashir *et al.*, 2001a; Reynolds *et al.*, 2004). Aus den siRNA Sequenzen wurden dann shRNA-Oligonukleotide mit den oben beschriebenen Eigenschaften (Loop, Bam HI und Eco RI-Überhänge, PolyT-Wiederholungen und Xho I Restriktionsstelle) konstruiert und in den Vektor pSIREN RetroQ-Neo kloniert.

Auf diese Weise wurden mehrere Vektoren kloniert, die verschiedene shRNA Moleküle exprimieren und unterschiedliche Regionen des GIPR-Gens adressieren. Für die in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse wurden die folgenden shRNA verwendet: sh.GIPR1, sh.GIPR3, sh.GIPR4 und sh.GIPR6. Als Negativkontrolle wurde sh.contr1 kloniert, die keine Homologien zu bekannten Genen aufweist. Dies wurde durch eine Analyse mit dem „Basic Local Allignment Search Tool“ (BLAST) des NCBI überprüft.

IV.2.5.2.2. Hybridisierung der Oligonukleotide („Annealing“)

Die gelieferten komplementären shRNA-kodierenden DNA-Oligonukleotide wurden in TE-Puffer gelöst, so dass eine Konzentration von 100 µM entstand. Die Oligonukleotide wurden in einem

Verhältnis von 1:1 zusammenpipettiert und mit TE-Puffer vermennt, dass eine 25 μM Lösung vorlag. Zum Aufbrechen der Sekundärstrukturen und Sicherstellen einer optimalen Hybridisierung wurden anschließend die Oligos wie folgt in einem Thermocycler erhitzt:

- 30 sec 95° C
- 2 min 72° C
- 2 min 37° C
- 2 min 25° C

Daraufhin wurden die Lösungen mit TE-Puffer 50fach verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,5, μM zu erhalten, und auf Eis gelagert. Wurde nicht umgehend eine Ligation durchgeführt, wurden die Oligos bei -25° C eingefroren.

IV.2.5.2.3. Ligation und Klonierung

Zur Durchführung der Ligationsreaktion wurde folgender Reaktionsansatz (10 μl gesamt) für jede hybridisierte Oligo-Probe vorbereitet:

- 1 μl pSIREN-RetroQ-Neo® (mit BamHI und EcoRI linearisierter Vektor, 25 ng/ μl)
- 1 μl hybridisierte Oligos (0,5 μM)
- 1 μl T4-Puffer (10fach Ligasepuffer)
- 0,75 μl T4-Ligase (400 U/ μl)
- 6,25 μl Wasser (RNase-frei)

Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert. Die T4-Ligase ist eine DNA-Ligase, die glatte und überhängende DNA-Enden kovalent verbinden kann. Zur späteren Kontrolle der Transformation bzw. anschließenden Transfektion wurde die Ligationsreaktion auch mit EGFP durchgeführt. Das EGFP-Konstrukt basiert auf einem Vektor der Firma Clontech (pLXSN) und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. D. Hadaschik zur Verfügung gestellt.

IV.2.5.2.4. Transformation

Zur Vervielfältigung der erstellten shRNA-Plasmide wurden diese in α -Select E.coli transformiert. Die verwendeten E.coli sind kompetente Bakterien, d.h. durch eine bestimmte Behandlung sind ihre Zellwände während eines kurzen Hitzeschocks (45sec; 42° C) für DNA durchlässiger gemacht worden. Einmal in der Zelle verfügen die Plasmide über einen bakteriellen Replikationsursprung (Origin of Replikation) der die aktive DNA-Replikation der Plasmide in Bakterien ermöglicht. Auf diese Weise werden die Plasmide in den Bakterien vermehrt und an die Nachkommen weitergegeben.

Für die Transformation wurde 1 μl Plasmidlösung in ca. 15-20 μl E.coli-Suspension, die zuvor auf Eis aufgetaut wurde, pipettiert und vorsichtig verteilt. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt

für 5 min auf Eis und dann für 45 sec bei 42° C in einem Wasserbad (ohne Rütteln). Daraufhin wurde das Röhrchen für 2 min wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die transformierten Bakterien für 1h bei 37° C geschüttelt. Nach Abschluss dieses Schrittes wurden die Lösungen auf eine LB-Agar-Kulturplatte ausgestrichen, die mit Ampicillin (50-100 µg/ml) beschichtet war. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37° C im Inkubator aufbewahrt.

Am Folgetag wurden sechs Bakterienkolonien pro Konstrukt mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in einem Röhrchen mit 6 ml LB-Medium aufgenommen. Es wurden stets einzelne, gut isolierte Kolonien gewählt. Als nächstes wurden die Röhrchen über Nacht in einem Bakterieninkubator bei 37° C bei leichtem Schütteln inkubiert. Die gesamten erwähnten Arbeitsschritte sollten in keimarmer Umgebung stattfinden, so dass unmittelbar neben der Werkbank ein Bunsenbrenner brannte.

Um die vervielfältigten Plasmide wieder aufzureinigen zu können, wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach den Herstellerangaben verwendet.

IV.2.5.2.5. Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Bevor die Konstrukte für die Erstellung der *Knock-down*-Zelllinien weiterverwendet wurden, musste kontrolliert werden, ob die gepickten Bakterienkolonien das richtig Plasmid enthielten, also die richtige shRNA in dem Vektor enthalten war, und ob diese unmutiert vorlag. Bei der Klonierung der shRNA-Oligonukleotide wurde eine weitere Xho I Restriktionsschnittstelle eingefügt. Nun wurden die isolierten Plasmide mit dem Restriktionsenzym XhoI gespalten, um die korrekte Insertion dieser Oligonukleotide nachzuweisen. Die Reaktion fand in einem 10 µl-Ansatz statt, der zunächst als Mastermix für alle Proben angesetzt wurde:

- 4 µl Miniprep-DNA
- 1 µl BSA
- 1 µl 10x NEB2-Puffer
- 0,1 µl XhoI (20 U/µl)
- 3,9 µl steriles Wasser

Die Spaltung wurde für mindestens zwei Stunden bei 37 °C in einem Heizblock durchgeführt und die Reaktionsgefäße danach wieder auf Eis gestellt. Ein kleiner Teil der Lösung konnte für die Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) verwendet werden (siehe dazu auch Kapitel IV.2.9). Bei erfolgreicher Klonierung der shRNA Oligonukleotiden mit Xho I Schnittstelle wurden nach dem Restriktionsverdau zwei DNA Fragmente erwartet, die als zwei Banden mit einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurden. Eine mit einer Größe von 5,26 kb und eine mit 1,34 kb. Wenn diese

zwei Banden vorhanden waren, wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um festzustellen, ob es zu einer Mutation gekommen war oder ob die Konstrukte weiter verwendet werden konnten.

Für die Sequenzierung wurde jeweils folgender Ansatz (20 µl) vorbereitet:

- 13 µl Miniprep-DNA (1 µg)
- 4 µl 5fach-Puffer
- 1 µl pSIREN Forward Primer (10 µM)
- 2 µl Big Dye

Folgende Temperaturstufen wurden für die Sequenzierung benutzt:

- 3 min 96 °C
- 25 mal: 30 sec 96° C, 20 sec 50 °C und 4 min 60 °C
- 20 sec 96°C

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend zur DNA-Fällung mit Folgendem aufgefüllt:

- 80 µl RNase-freies Wasser
- 10 µl Natriumacetat (3 M)
- 250 µl Ethanol (100%)

Das Gemisch wurde auf einem Vortexer gut gemischt und dann für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Reaktionsgefäß wurde offen bei RT für ca. 10-20 min zur Lufttrocknung stehen gelassen.

Danach wurde die eigentliche Ermittlung der Sequenz vorgenommen, deren Durchführung freundlicherweise von der AG Prof. Hiort übernommen wurde.

IV.2.5.2.6. Vermehrung der Klone (Retransformation)

Nach Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Klone konnten die Proben identifiziert werden, in denen sich die korrekten shRNA-Sequenzen ohne Mutation befanden. Wurden für eine shRNA in keiner Probe die passende Sequenz gefunden, wurden die Schritte ab IV.2.5.2.3 wiederholt.

Es erfolgte nun eine erneute Transformation, um eine größere Menge an Plasmid-DNA zu erhalten. Dazu wurde analog zur bereits beschriebenen Transformation vorgegangen (IV.2.5.2.4).

IV.2.5.2.7. Transfektion

Der Vektor pSIREN-RetroQ kodiert ein retrovirales Genom, bei dem weite Teile der zur Replikation nötigen viralen Gene deletiert wurden und durch die shRNA Expressionskassette und das Neomycin-Resistenzgen mit Promoter ersetzt wurden. Um also reife Viren herzustellen, müssen diese Vektoren zunächst in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden, in die sogenannten BOSC-

Zellen. Diese exprimiert alle zur Virusreplikation nötigen viralen Gene und verpackt das transkribierte virale RNA-Genom von pSIREN in die Viruspartikel. Letztere schnüren sich von der Zellmembran ab und werden in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Dieser Überstand wurde sterilfiltriert und in das Kulturmedium der Präadipozyten gegeben, um diese zu infizieren. Die infizierten Zellen integrieren dann das virale Genom in das zelleigene Genom von dem in der Folge die shRNA und das Neomycin-Resistenzgen exprimiert werden. Solche Zellen können dann mit dem Antibiotikum Neomycin (G418) selektiert werden.

Alle im Folgenden erklärten Zellversuche wurden wie auch die Adipozytendifferenzierung auf einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zunächst wurden unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer die BOSC-Zellen gezählt, um anschließend $1,7 \times 10^6$ Zellen in kleine Kulturflaschen (25 cm^2) auszusäen. Nach Hinzugabe des Kulturmediums (6 ml DMEM mit 10% FBS) wurden die Zellen gut verteilt und im Kulturschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 für ca. 24 Stunden kultiviert bis maximal eine $\frac{2}{3}$ -Konfluenz erreicht war. Für die Transfektion der BOSC-Zellen wurden OptiMEM und Fugene 6 verwendet. Fugene ist ein nicht liposomales Transfektionsreagenz und besteht aus mehreren Komponenten, die eine geringe Toxizität und eine hohe Effizienz der Transfektion ermöglichen; OptiMEM ist ein spezifisches Zellmedium. Zunächst wurden 5 μg Plasmid in 50 μl OptiMEM aufgenommen. Danach wurden pro Ansatz 450 μl OptiMEM und 15 μl Fugene in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert, für 5 min inkubiert und anschließend zu den 50 μl Plasmidlösung hinzugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Dann konnte die Transfektionslösung vorsichtig in die Kulturflaschen auf die Zellen pipettiert werden. Die Zellen wurden nun für 48 Stunden im Kulturschrank gelassen, bevor mit der Infektion der Adipozyten fortgefahren wurde. Bei jeder Transfektion wurde auch pLXSN-EGFP in einem weiteren Ansatz in BOSC-Zellen transfiziert und nach 48-72 Stunden konnte in den erfolgreich transfizierten Zellen die grüne EGFP-Fluoreszenz im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden.

IV.2.5.2.8. Infektion der Wildtypzellen und Selektion

Für die Infektion der Präadipozyten wurden 3 ml des Virusüberstandes verwendet, der zunächst steril filtriert (0,45 μm -Filter) wurde. Um die Interaktion zwischen Zellen und Retroviren zu erhöhen wurde dem Medium das kationische Polymer Polybrene hinzugefügt (Davis *et al.*, 2004). Dazu wurde 1 ml DMEM (20% FBS) mit Polybrene (16 g/ml) zu 3 ml Virusüberstand hinzugefügt, so dass die finale Polybrene-Konzentration 4 $\mu\text{g/ml}$ betrug.

Am Tag vor der Infektion wurden 50.000 Präadipozyten in eine 25cm^2 -Gewebekulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium komplett von diesen Zellen (Wildtypzellen mit ca. 80%iger Konfluenz) entfernt und durch die Viruslösung mit Polybren ersetzt und für 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen gesplittet und pro Konstrukt auf zwei 25cm^2 -Kulturplatten ver-

teilt. Nach weiteren 24 Stunden wurde mit der Selektion begonnen. Dafür wurde das Grundmedium mit 600 µg/ml Geneticin (G418) gemischt. Zellen, die positiv infiziert wurden, exprimieren von dem integrierten viralen Genom das Neomycin-Resistenzgen und sind daher vor der toxischen Wirkung des Geneticins geschützt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass ausschließlich die infizierten Zellen überleben und für spätere Versuche verwendet wurden. Die Selektion wurde für eine Woche durchgeführt bis kein Zelltod mehr eintrat, also von einer erfolgreichen und vollständigen Elimination der nicht infizierten Zellen ausgegangen werden konnte. Als Kontrolle wurden zur selben Zeit nicht infizierte Präadipozyten mit demselben Geneticin-haltigen Medium inkubiert, um zu verfolgen wann alle Zellen abgestorben sind. Nach der Selektion wurde die Zellen wie in Kapitel IV.2.2 und IV.2.3 beschrieben kultiviert.

In dem Überstand der pLXSN-EGFP transfizierten BOSC-Zellen, befinden sich Viren, die eine EGFP-Expressionskassette enthalten. Diese Viren wurden zur Kontrolle der Infektionseffizienz ebenfalls auf Präadipozyten gegeben. Die erfolgreich infizierten Zellen leuchten im Fluoreszenzmikroskop grün.

IV.2.5.2.9. Aussaat der shRNA-Zelllinien

Für die Versuchsdurchführung wurden von jeder *Knock-down*-Zelllinie zwei 25cm²-Kulturplatten verwendet, um ausreichend Zellen für weitere Experimente anzuzüchten. Nach der Aussaat wurden die Zellen bis zu einer 80%igen Konfluenz herangezogen. Die verschiedenen *Knock-down*-Zelllinien wurden dann gezählt und alle am selben Tag in die entsprechenden Kulturgefäße für weitergehende Experimente ausgesät und wie beschrieben differenziert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen:

- Tag 0 mRNA-Analyse
- Tag 3 mRNA-Analyse
- Tag 6 mRNA-Analyse
- Tag 0 Oil Red O Analyse
- Tag 3 Oil Red O Analyse
- Tag 6 Oil Red O Analyse

Der Ablauf für die Erstellung von stabilen *Knock-down*-Zelllinien wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Das erste Mal für: sh.GIPR1, shGIPR3 und sh.contr1. Das zweite Mal für: sh.GIPR1, sh.GIPR4, shGIPR6, sh.contr1 und Wildtypzellen. Daher lagen für die Analyse Daten aus sechs Replikaten für sh.GIPR1 und sh.contr1 und aus drei Replikaten für sh.GIPR3, sh.GIPR4, sh.GIPR6 und Wildtypzellen vor. Im zweiten Durchgang wurden für die Oil Red O Analyse mehr Platten ausgesät, weil neben der Verwendung des „normalen“ Induktionsmediums auch die Bedingungen

Induktionsmedium ohne Dexamethason, Induktionsmedium ohne Indomethacin und Induktionsmedium ohne IBMX gebraucht wurden.

Zur vereinfachten Darstellung werden im Folgenden die Zelllinien aufsteigend nummeriert: „shRNA1“ entspricht sh.GIPR1, „shRNA2“ entspricht sh.GIPR3, „shRNA3“ sh.GIPR4, „shRNA4“ shGIPR6 und „Negativkontrolle“ entspricht sh.contr1.

IV.2.6. RNA-Isolation

Nach Abschluss der jeweiligen Experimente wurden die differenzierten Zellen mit kaltem PBS vorsichtig zweimal gewaschen, nach Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren und dann bei ca. -150° C gelagert.

Zur Isolation der gesamten RNA wurde die Phenol-Chloroform-Aufreinigung herangezogen. Dazu wurde zunächst für die Zellyse 1 ml Trizol bzw. Quiazol-Reagenz bei 10 cm großen Zellkulturschalen und 0,5 ml bei Sechslochplatten auf die gefrorene Platte gegeben und durch Schwenken verteilt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Platte gelöst und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach gründlichem Schütteln für zehn Minuten bei 13000 rpm (4° C) zentrifugiert, so dass sich drei Phasen bildeten. Zur Reinigung wurde der Überstand zwischen Pellet und Fettfilm in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 250 µl Chloroform (bzw. bei Sechslochplatten 125 µl) hinzugegeben. Nach ca. 15-sekündigem Schütteln auf dem Vortexer wurde die Proben bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert und danach erneut für 10 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4° C). Nach diesem Arbeitsschritt wurde auf eine RNase-freie Umgebung geachtet. Die wässrige Phase konnte nach der Zentrifugation zusammen mit derselben Menge kaltem 2-Propanol in einem RNase-freien Reaktionsgefäß nach kurzem Schwenken für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4° C) werden. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Überstand verworfen, 75%iges Ethanol (in DEPC-Wasser) hinzugegeben und ausführlich geschüttelt, um nach erneutem Zentrifugieren (13000 rpm, 4° C) das Pellet in 40 µl RNase-freiem Wasser aufzunehmen.

IV.2.7. DNA-Verdau

Nach der RNA-Isolation wurden die Proben mithilfe des Ambion-DNA-free-Kit gemäß Herstellerangabe aufgereinigt, um eine Verunreinigung der Proben mit DNA zu verhindern. Für die Verwendung des Kits wurden 0,5 ml große RNA-freie Reaktionsgefäße verwendet, eine Reaktionsmenge von 50 µl und das Protokoll „Routine DNase treatment“ für die Entfernung von 2 µg genomischer DNA bei bis zu 10µg RNA pro 50 µl-Ansatz gewählt. Für die Aufreinigung wurden 1 ml rDNase, 5 µl des 10fach DNase I Buffer (0,1faches Volumen) und 5 ml Wasser (Nucleotide-free) pro Probe

gemischt. Es wurde je nach Anzahl der Proben vorher eine Stammlösung mit Überstand angesetzt. Es wurden 11 µl der DNase-free-Stammlösung mit 39 µl Probe vermischt und bei 37° C 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Inactivation Buffer beendet. Unter mehrfachem Mischen wurde der Reaktionsansatz mit dem Inactivation Buffer 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1,5 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugierschritt konnte der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

IV.2.8. Bestimmung der RNA-Menge

Zur Bestimmung der RNA-Menge der Proben wurde eine photometrische Messung herangezogen. Dazu wurde von jeder Probe eine 1:50-Verdünnung hergestellt und diese bei 260 nm gemessen. Die RNA-Menge musste für das Umschreiben in cDNA bestimmt werden. Außerdem wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen, um den Quotienten 260/280 bilden zu können. Dieser Quotient sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen und gibt einen Hinweis auf die Reinheit der Probe. An dieser Stelle wurden die Proben entweder gleich in cDNA umgeschrieben oder bei ca. -70° C aufbewahrt.

IV.2.9. Gelelektrophorese

Eine weitere Möglichkeit, die RNA-Probenqualität zu überprüfen oder das Produkt einer qualitativen PCR aufzutrennen, ist die Gelelektrophorese. Hierbei werden die elektrisch geladenen Nucleinsäuren durch Anlegen eines elektrischen Feldes (ca. 80 mA) nach Ladung und Größe Richtung Anode getrennt.

Es wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet, das mit Ethidiumbromid versetzt wurde. Es wurden 100 ml TBE-Puffer mit 2 g Agarosepulver in einer Mikrowelle aufgekocht bis eine homogene Lösung entstanden war. Eine Gelkammer wurde mit einem Kamm versehen und die Ränder mit Klebeband abgeschlossen. Das leicht erkaltete, flüssige Gel wurde mit 10 µl ETB vermischt und in die Gelkammer gegossen. Nach vollständigem Erkalten wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die aufzutragende Probe wurde mit Bromphenolblau (ca. 25% des Probenvolumens) als Ladepuffer gemischt und in die Gelaschen pipettiert. Durch Verwendung einer fertigen Lösung aus Bromphenolblau und Markermolekülen (DNA-Leiter) konnte eine genaue Größenbestimmung vorgenommen werden, was insbesondere bei der qualitativen PCR notwendig war (s. Kapitel IV.2.11.2). Nachdem die Proben das Gel ungefähr zu 75% durchlaufen hatten (erkennbar am Bromphenolblau), wurde das elektrische Feld entfernt und es konnte eine Fotodokumentation des Bandenmusters in der Dunkelkammer

vorgenommen werden. Durch ultraviolettes Licht wurde das in die Nukleotidketten interkalierte ETB angeregt und zum Leuchten gebracht.

Bei einer sauberen RNA-Probe mit intakter RNA waren zwei Banden zu erkennen, zum einen die 18s-Bande und zum anderen die 28s-Bande für ribosomale RNA. Diese Qualitätsüberprüfung wurde regelmäßig durchgeführt.

IV.2.10. Herstellung von cDNA

Die isolierte und aufgereinigte RNA wurde mit der Superscript II Reverse Transcriptase von invitrogen in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 4 µg RNA der jeweiligen Probe (das benötigte Volumen wurde durch die Bestimmung der RNA-Menge ermittelt, s. Kapitel IV.2.8) mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde zu jeder Probe 2 µl randomisierte Oligo-dt-Primer (10 µM) und 2 µl dNTP-Mix (2,5 mM) hinzugegeben; wurden mehrere Proben umgeschrieben, wurde zu Beginn des Versuchs eine Stammlösung mit Überstand angesetzt und auf Eis gelagert. Das erhaltene Gemisch wurde für 5 min bei 65° C inkubiert. Nach diesem Schritt wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

- 8µl 5facher First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei Raumtemperatur),
- 2 µl DTT (0,1 M),
- 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (200 u/µl) und
- 1µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)

und 60 min bei 45 °C und weitere 15 min bei 70 °C inkubiert. Während des Pipettierens zwischen den Schritten wurden die Proben auf Eis gestellt, um ein weiteres unkontrolliertes Reagieren zu verhindern. Auch bei der zweiten Lösung wurde bei mehreren umzuschreibenden Proben zunächst eine Stammlösung angelegt und für kurze Zeit auf Eis gelagert.

Nach Abschluss der Reaktion konnten die Proben für eine PCR verwendet werden oder bei ca. -70° C eingefroren werden.

IV.2.11. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekulargenetische Methode, mit der spezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt werden können, um eine weitere Analyse zu ermöglichen. In mehreren Schritten werden zunächst die DNA-Stränge getrennt (Denaturierung), anschließend die sequenzspezifischen Primer gebunden (Annealing) und zuletzt die Stränge von den Primern aus durch Polymerasen entsprechend der Sequenz des Gegenstranges neu gebildet (Polymerisation). Dies stellt einen Zyklus dar, mit jedem Zyklus verdoppelt sich demnach die DNA-Menge. Die dazu benötigten Temperaturen werden

durch einen Thermocycler gewährleistet und die Zyklen nacheinander ca. 30 bis 40mal wiederholt bis genügend DNA-Material zur Verfügung steht.

Prinzipiell kann man die qualitative von der quantitativen PCR unterscheiden. Die qualitative wird verwendet, um bestimmte Gene nachzuweisen; während die quantitative PCR einen Eindruck von der Menge eines Gens oder vielmehr von der Menge einer mRNA und damit der Genexpression vermittelt. Für die Versuche, die mit den GIPR-KO-Zellen und den GIPR-KI-Zellen gemacht wurden, war die qualitative PCR die geeignete Methode, um das Vorhandensein bzw. das Fehlen des Rezeptors nachzuweisen. Für den Nachweis der Blockierung des GIPR mittels RNA Interferenz wurde die quantitative PCR herangezogen, um im Vergleich zu einer Kontrollprobe die Häufigkeit des Rezeptors zu überprüfen. Auch die Messung der Differenzierungsmarker in den *Knock-down*-Proben wurde mithilfe der quantitativen PCR durchgeführt.

IV.2.11.1. Primer-Design

Anhand der Sequenz, die in der Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) zu finden ist, können die spezifischen Primer hergestellt werden. Mithilfe des Programms Primer Design der Firma Applied Biosystems wurden optimale Primersequenzen erstellt. Zur Sicherung der Spezifität wurde die erhaltene Primersequenz mit allen bekannten Genomen mittels Basic Local Allignment Search Tool (BLAST) gegengeprüft. Die Synthese der Primer wurde von der Firma Biometra in Göttingen übernommen. Vor Verwendung der Primer wurde ein Linearitätstest durchgeführt, um die optimale Verdünnungsstufe zu testen und eine Dissoziationskurve angefertigt (Bookout, 2005). Durch diese Schritte ist für jeden Primer ein bestimmtes PCR-Protokoll entstanden.

IV.2.11.2. Qualitative PCR

Für die qualitative PCR wurden im Rahmen dieser Arbeit die Primer LX1 und MC4R für die Versuche mit den GIPR-KO-Zellen und der Primer rGIPR für die Versuche mit den GIPR-KI-Zellen verwendet.

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l angegeben:

- 2 μ l Probe
- 0,5 μ l Forward Primer
- 0,5 μ l Reverse Primer
- 1 μ l dNTP-Mix
- 2,5 μ l 10fach-Puffer (für hohe Erträge)
- 0,5 μ l TAQ-Polymerase
- 18 μ l RNase-freies Wasser

Die PCR-Zyklen für die verschiedenen Primer unterschieden sich in der Annealing-Temperatur wie folgend dargestellt:

- 3 min 94 °C Anfangsdenaturierung
- 40 mal:
 1. 45 sec 94 °C
 2. 30 sec 57,7 °C (LX1)
56,9 °C (MC4R)
70,0 °C (rGIPR)
 3. 45 sec 72 °C
- 7 min 72 °C Abschlussamplifikation

Die Ansätze wurde jeweils auf Eis zusammenpipettiert und anschließend für die Durchführung nach entsprechender Zyklusprogrammierung in einem Thermocycler der Firma Eppendorf gesetzt. Anschließend wurde das Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt und fotografisch dokumentiert (s. Kapitel IV.2.9).

IV.2.11.3. RT-PCR

RT-PCR steht in dieser Arbeit für Realtime-PCR und stellt eine quantitative PCR-Methode dar. Der Name bezieht sich darauf, dass bereits während der Durchführung eine Auswertung der eingesetzten DNA-Menge stattfindet. Es wird ein Farbstoff (SYBR-Green) verwendet, der sich in doppelsträngige Nukletidketten einlagert und ein Fluoreszenzsignal emittiert, das von dem PCR-Gerät (realplex von der Firma Eppendorf) nach Abschluss jedes Zyklus registriert wird. Dieses Fluoreszenzsignal steigt proportional zur DNA-Menge an. Durch ein gleichzeitig in derselben Ausgangsprobe gemessenes Referenzgen (nicht reguliertes Gen) kann am Ende der PCR durch Vergleich des logarithmischen Anstiegs in der Zielprobe und der Referenzprobe auf die Ausgangsmenge geschlossen werden.

Zur Versuchsdurchführung wurden 96-Loch-Platten verwendet und von allen Proben Doppelwerte bestimmt. Parallel wurde für jeden Primer und Reaktionsansatz eine „No-Template-Control“ mitgeführt, in der anstatt einer Probe das entsprechende Volumen RNase-freies Wasser eingesetzt wurde. Dadurch sind mögliche Verunreinigungen zu detektieren. Für die Quantifizierung des GIPR wurde der Primer LX2 und für die Quantifizierung des Referenzgens wurde der Primer 36B4 verwendet. Die Differenzierungsmarker wurden mit den Primern Pref1, PPAR γ und aP2 gemessen. Die verwendete SYBR-Solution von TaKaRa besteht laut Herstellerangabe aus folgenden Inhaltsstoffen: RNase-freies Wasser, 50%iges Glyzerin, 10fach Puffer, 100%iges DMSO, 25 mM MGCl₂, Reference Dye, 20 mM dNTP working solution, SYBR Green, TAQ-Polymerase.

Es wurde eine „2Step-PCR“ gewählt, in der die beiden Schritte der Primerhybridisierung und der Polymerisation auf einen Schritt verkürzt werden.

Das PCR-Zyklesschema sah wie folgt aus:

- 10 min 95,0 °C
- 40mal 20 sec 95,0 °C und 30 sec 60 °C
- Schmelzkurve (von 60,0 bis 95,0 °C in 15 sec-Schritten)

Für die Analyse der Ergebnisse und die Bestimmung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta$ -Ct-Methode verwendet.

Für die $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wurde die relative Expression nach folgendem Quotienten bestimmt:

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{E target})^{\Delta\text{CP target (mean control)} - (\text{mean sample})}}{(\text{E reference})^{\Delta\text{CP reference (mean control)} - (\text{mean sample})}}$$

Bei der Standardkurvenmethode wird für das „Gene of Interest“ (engl. für: Gen des Interesses) und das Referenzgen bei jedem PCR-Durchlauf eine Standardkurve produziert, indem jeweils eine Verdünnungsreihe mit standardisierter cDNA (z.B. die Wildtypkontrolle an Tag 6 mit der höchsten Genexpression) angesetzt wird und eine lineare Regressionanalyse durchgeführt wird. Anhand der errechneten Formel kann in jeder Probe auf die Genquantität geschlossen werden (Bookout, 2005). Die Berechnung wurde mit dem Programm Excel aus dem Microsoft Office Paket 2007 durchgeführt. Anschließend wurden die Ct-values der Probe und des entsprechenden Referenzgens in Relation gesetzt und als relative Expression angegeben.

IV.2.12. Statistik und Darstellung

Für die Darstellung der ermittelten Werte wurden Balkendiagramme gewählt. Bei Versuchsreplikation wurden Mittelwerte und Standardabweichung bestimmt. Bei mehreren Versuchswiederholungen wurde eine Normalverteilung postuliert und der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben zur Signifikanzberechnung angewendet. Ab einem $P \leq 0,05$ wurde statistische Signifikanz, für ein $P \leq 0,01$ wurde statistisch hohe Signifikanz angenommen und in den Balkendiagrammen mit „*“ bzw. „**“ gekennzeichnet. Die Berechnungen und Diagrammgestaltungen wurden mit dem Programm Excel aus dem Microsoft Office Paket 2007 durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

V.1. GIPR-KO-Zellen

Es erfolgte die Validierung des GIPR-*Knock-Outs* zur Komplettierung der Vorversuche, die einen Zusammenhang zwischen dem GIPR und der adipozytären Differenzierung nahe legten. In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer qualitativen PCR dargestellt, für die GIPR-KO-Zellen aus vier verschiedenen Zelllinien und inguinale Wildtypzellen als Kontrolle bis Tag 6 differenziert wurden. Neben einem Primer für den GIPR (Primer LX1) wurde ein Primer zur Detektion des Melanokortin-4-Rezeptors als Ladekontrolle verwendet. Das zu erwartende Reaktionsprodukt bei Verwendung des GIPR-Primers befindet sich bei Detektion von genomischer DNA bei 504 Basenpaaren, das des MC4R-Primers bei 501 Basenpaaren.

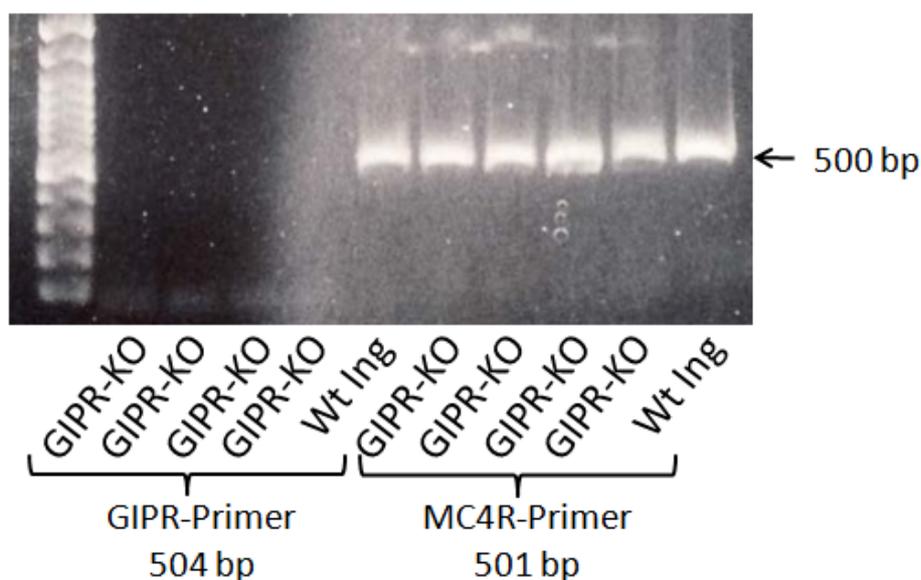


Abbildung 7: Der GIPR wird in den GIPR-KO-Zellen nicht kodiert. Dargestellt ist das gelelektrophoretische Ergebnis einer qualitativen PCR. Unter Verwendung eines GIPR-Primers (Produkt bei 504 bp) und eines Primers für MC4R (Produkt bei 501 bp) als Ladekontrolle. Überprüft wurden jeweils vier verschiedene KO-Zelllinien und inguinale Wildtypzellen als Kontrolle.

In den linken fünf Geltaschen wurden die PCR-Produkte aufgetragen, für die der GIPR-Primer verwendet wurde. In den ersten vier Bahnen stellt sich keine Bande dar, so dass in diesen Zelllinien kein Expressionsprodukt des GIPR vorliegt. In der fünften Bahn wurde Material von inguinale Wildtypzellen aufgetragen; hier stellt sich auf der erwarteten Höhe eine deutliche Bande und damit der GIPR-Expressionsnachweis dar.

Als Ladekontrolle wurde für alle Proben der bereits vorher erfolgreich angewendete MC4R-Primer benutzt. Diese PCR-Produkte wurden in den rechten fünf Bahnen in entsprechender Reihenfolge aufgetragen. Für alle Proben ergab sich eine Bande auf der Höhe von 501 Basenpaaren.

V.2. GIPR-Reexpression

Abbildung 8 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des Reaktionsproduktes einer qualitativen PCR, die dem Nachweis der erfolgreichen GIPR-Reexpression diene. Es wurde ein Primer verwendet, der die Sequenz des transfizierten Ratten-GIPR detektiert. Das erwartete Produkt ist 1300 Basenpaare lang. Als Positivkontrolle wurde die gesamte GIPR-Sequenz aus dem pBABE-Transfektionsvektor verwendet. Für die Templates wurden jeweils zwei unterschiedlichen Zellreihen für GIPR-KI-, GIPR-KO- und WT-Zellen verwendet.

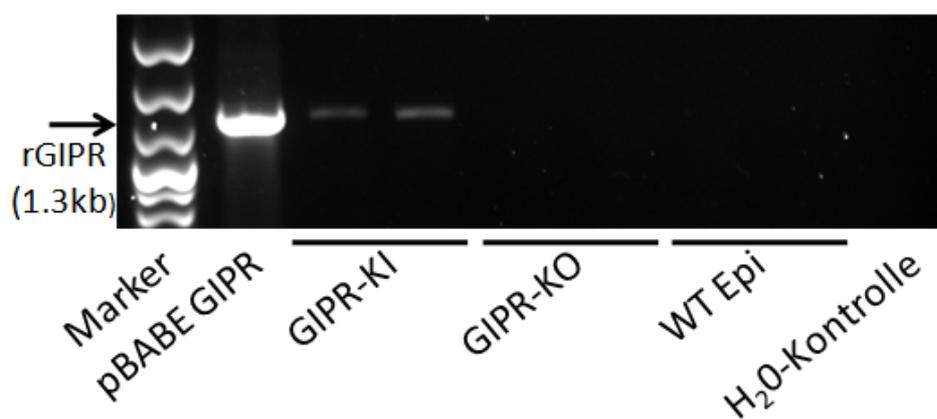


Abbildung 8: Qualitativer Nachweis der GIPR-Reexpression in GIPR-KO-Zellen. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung einer qualitativen PCR. Der Transfektionsvektor als Positivkontrolle und jeweils zwei Zelllinien für KO-Zellen, KI-Zellen und epididymale Wildtypzellen. Die Wasserkontrolle ist als No-Template-Kontrolle dargestellt. Das erwartete Produkt ist bei 1300 bp zu finden.

Auf der erwarteten Höhe von 1300 Basenpaaren ist eine deutliche Bande bei der Positivkontrolle und den Gelbahnen für die beiden GIPR-KI-Proben zu erkennen. Die Bande der pBABE GIPR-Sequenz stellt sich im Vergleich etwas deutlicher dar. Es zeigt sich keine Bande bei den GIPR-KO-Zellen und WT-Zellen. Auch in der Wasserkontrolle als No-Template-Kontrolle ist keine Bande zu erkennen.

V.3. GIPR-Expression in Wildtypzellen während der Differenzierung

Um die Rolle des GIPR bei der Fettzellendifferenzierung weiter zu untersuchen, wurde das Expressionsmuster während der Differenzierung überprüft. In Abbildung 9 ist das Ergebnis einer quantitativen RT-PCR dargestellt. Dabei wurden epididymale WT-Zellen aus drei verschiedenen Zellreihen verwendet und an den Zeitpunkten Tag 0, Tag 3 und Tag 6 die GIPR-Expression gemessen und durch Vergleich mit dem Referenzgen als relative Expression angegeben.

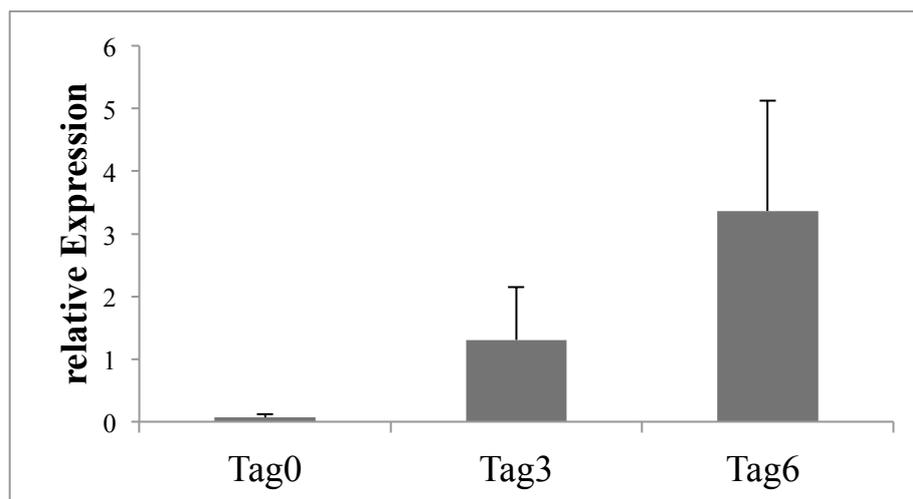


Abbildung 9: Differenzierungsabhängige Zunahme der GIPR-Expression während der Differenzierung. Ergebnis einer quantitativen PCR. Als Template dienten Wildtypzellen an Tag 0, Tag 3 und Tag 6. Gemessen wurde die Menge des GIPR, dargestellt ist die relative Expression. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung nach drei unabhängigen Versuchen (n= 3).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des GIPR mit der Zeit zunimmt. Die GIPR-Expression nimmt im Mittel von Tag 0 zu Tag 3 um das 18,6fache und zu Tag 6 um das 48fache zu. Während der Fettzellendifferenzierung nimmt der GIPR quantitativ zu und liegt in ausdifferenzierten Adipozyten vermehrt vor.

V.4. Verwendung von siRNA zum transienten *Knock-down* des GIPR in Wildtypzellen

Zur Beantwortung der Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen dem GIPR und der adipozytären Differenzierung wurde die RNA Interferenz als geeignete Technik herangezogen, um eine akute Hemmung zu erreichen und in Vergleich zu der dauerhaften Hemmung des GIPR in den *Knock-out*-Zellen zu setzen.

Wildtypzellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung verwendet, um siRNA in die Zellen einzubringen. Für diese Transfektion wurden verschiedene Techniken ausprobiert; zunächst das Amaxa® Nucleofector®-Kit, anschließend das Lipofectamine™ 2000-Reagenz von Invitrogen.

V.4.1. Transfektion mittels Elektroporation (Amaxa® Nucleofector®)

Im Folgenden werden drei beispielhafte Versuche beschrieben, die RNA Interferenz mittels Nucleofection auf das adipozytäre GIPR-System anzuwenden.

Abbildung 10 zeigt einen exemplarischen Versuch, mit Amaxa® Nucleofector® GIPR-siRNA zu transfizieren. Die Präadipozyten wurden zwei Tage nach Aussaat vor Erreichen der vollständigen Konfluenz (24 Stunden vor Induktion) nach Herstellerprotokoll transfiziert und nach dem Standardprotokoll weiter kultiviert. Gezeigt ist die GIPR-Expression an den Tagen 1 bis 4 nach Transfektion mit siRNA1 in 100 (blaue Balken) bzw. 200 pmol (rote Balken). Die Expression wurde jeweils in Relation zu der Rezeptorexpression in der Negativkontrolle (Allstar-Negative-Control-siRNA) gesetzt. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass die Expression des GIPR bei Verwendung von 100 pmol siRNA1 im Vergleich zur neg. siRNA-Kontrolle an Tag 1, 2 und 4 geringer (entspricht kleiner 1) und am Tag 3 (größer 1) erhöht ist. Es ist kein einheitliches Verhalten der Expression in den siRNA 1-Proben zu erkennen.

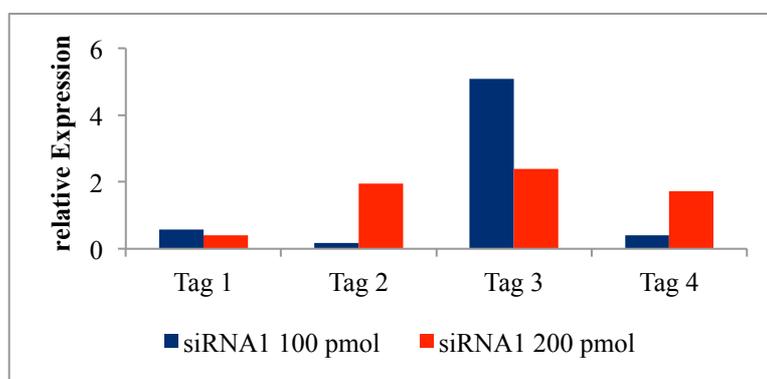


Abbildung 10: Expression des GIPR (in Relation zu neg. siRNA) an den Tagen 1 bis 4 der Differenzierung. Transfektion mit 100 (blaue Balken) bzw. 200 pmol (rote Balken) siRNA1 in Präadipozyten (zwei Tage nach Aussaat, ein Tag vor Erreichen der Konfluenz) mittels Amaxa® Nucleofector®. Durchführung einer Versuchsreihe (n=1).

Derselbe Versuch mit erhöhter siRNA-Menge (200 pmol) erbringt ebenfalls ein inkonsistentes Verhalten. Liegt die Expression in der siRNA-Probe an Tag 1 noch unter der der Kontrolle, ist sie an den folgenden Tagen höher (2 bis 2,5fach).

Abbildung 11 zeigt einen weiteren Versuch, den GIPR mit der Verwendung von zwei unterschiedlichen siRNA zu vermindern. Beide siRNA (siRNA1 blaue und siRNA2 grüne Balken) und die Kontrolle wurden mit 100 pmol eingesetzt. Im Unterschied zum oben dargestellten Versuch wurden die Zellen im Kultivierungsprotokoll nach Transfektion einen Tag später induziert. Außerdem wurden Wildtypzellen mitgeführt, die der Elektroporation und dem Transfektionsreagenz jedoch keiner siRNA ausgesetzt waren (schwarze Balken).

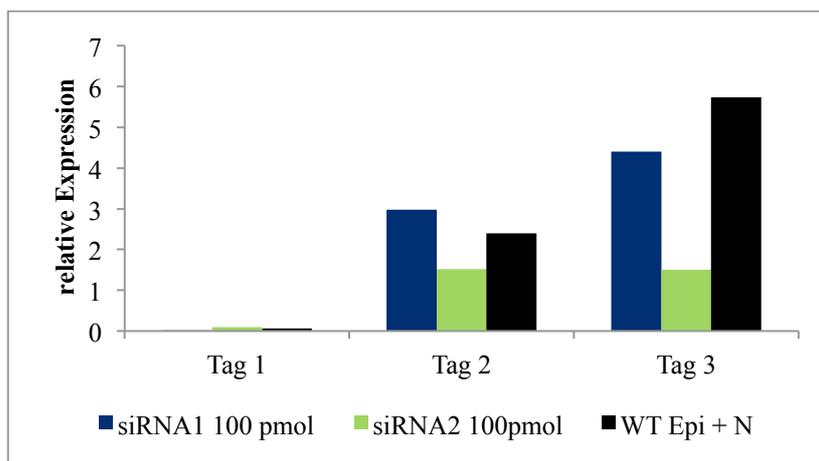


Abbildung 11: Expression des GIPR (in Relation zu neg. siRNA) an den Tagen 1, 2 und 3 der Differenzierung. Transfektion mit jeweils 100 pmol siRNA1 und siRNA2 im Präadipozyten-Stadium (zwei Tage nach Aussaat, zwei Tage vor Erreichen der Konfluenz) mittels Amaxa® Nucleofector®. Außerdem Mitführen von Wildtypzellen, die Elektroporation und Transfektionsreagenz ohne siRNA erhalten haben. Durchführung einer Versuchsreihe (n=1).

Nachdem an Tag 1 nach Induktion (72 Stunden nach Transfektion) in beiden Proben die GIPR-Expression nur knapp die Nachweisgrenze überschreitet, ist an Tag 2 und 3 die Rezeptor-Expression über der in der Negativkontrolle (siRNA1 2,9 bis 4,4mal, siRNA2 1,5mal). Die Expression in der Wildtypkontrolle ist an Tag 1 ebenfalls sehr gering, an Tag 2 und 3 höher als in der Negativkontrolle (2,4mal bzw. 5,7mal). Die in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellten Versuche zeigen ein unregelmäßiges Verhalten des GIPR nach Einsatz des Amaxa® Nucleofector®. Auch zeigen die Proben, die zur Transfektion einen Stromimpuls erhalten haben, ein hohes Zellschicksal auf, was an der Zelldichte auf den Kulturplatten gut zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnten die Effekte nicht reproduziert werden, so dass diese Transfektionstechnik verlassen und zunächst das Lipofectamine™ 2000-Reagenz von der Firma Invitrogen getestet wurde.

V.4.2. Transfektion mittels lipophilen Transfektionsreagenz (Lipofectamine™ 2000)

Mit dem Lipofectamine™ 2000-Reagenz sollte eine hohe Transfektionseffizienz ohne weitere Beeinträchtigung der Zelle erreicht werden. Neben der Transfektionstechnik wurden weitere Veränderungen an dem Versuchsablauf vorgenommen, um eine transiente Verminderung des GIPR auf posttranskriptionaler Ebene zu erreichen.

Abbildung 12 zeigt einen Versuch, mittels Lipofectamine™ 2000 einen *Knock-down* zu erreichen. Es wurden die siRNA1 (blau) und 2 (rot) mit je 200 pmol eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde erneut die Allstar-Negative-Control-siRNA von Qiagen verwendet. Es ist die Expression des GIPR abgebildet, die in Relation zu der in der Negativkontrolle berechnet wurde. Über dem Balkendiagramm sind zur Veranschaulichung des Differenzierungsverhaltens Mikroskopiebilder der dazugehörigen Zellen (inklusive der Negativkontrolle) an Tag 3 in 40facher Vergrößerung zu sehen. Aus diesen Bildern geht hervor, dass die Verwendung des Lipofectamine™ 2000-Reagenz und der Qiagen-siRNA keine mikroskopisch sichtbaren Auswirkungen auf Zellmorphologie und Fetteinlagerung hat.

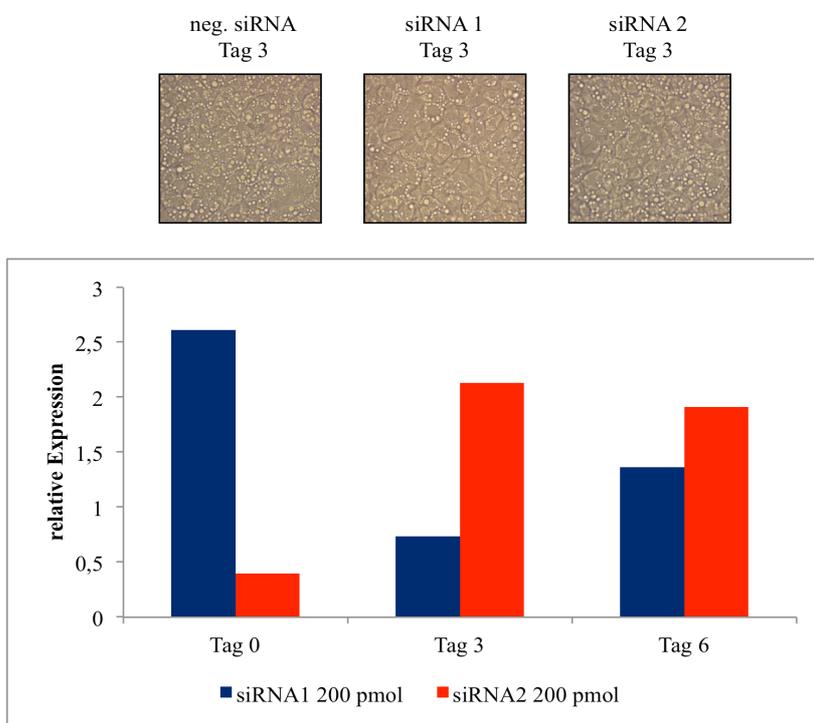


Abbildung 12: Expression des GIPR an den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung. Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000-Reagenz direkt vor Induktion, Inkubation für sechs Stunden mit neg. siRNA, siRNA1 und siRNA2, jeweils 200 pmol. Die Expression ist dargestellt in Relation zur Expression in der Negativkontrolle. Darüber sind Mikroskopiebilder der dazugehörigen Zellen an Tag 3 in 40x-Vergrößerung zu sehen (n=1).

Aus Abbildung 12 wird außerdem deutlich, dass trotz Verwendung der siRNA kein durchgehender Effekt auf die GIPR-Expression erzielt wurde. Ist bei Verwendung der siRNA2 an Tag 0 zunächst eine 0,4fache Expression des GIPR in Vergleich zur Negativkontrolle zu messen, ist sie an Tag 3 2,2fach; andersherum verhält es sich für siRNA 1 (Tag 0 2,6fach; Tag 3 0,7fach). An Tag 6 liegt für beide Proben eine 1,4 bis 1,9fache Expression vor. Wiederholungen des Versuches ergaben keine wesentlichen Veränderungen des Ergebnisses, es waren keine reproduzierbaren, systematischen Effekte auf die Rezeptorexpression zu erreichen.

Um die Effizienz eines konsistenten *Knock-downs* zu erhöhen, wurde in folgendem Versuchansatz (Abbildung 13) ein Pool aus unterschiedlichen GIPR-spezifischen siRNA gewählt. Diese setzten sich zusammen aus den bereits vorher verwendeten siRNA von Qiagen und einer weiteren als siRNA3 bezeichneten siRNA von Qiagen. Es wurde Pools mit siRNA 1+2 (hellgrüne Balken) bzw. 1+2+3 (hellblaue Balken) gebildet, die zu gleichen Teilen mit einer Endkonzentration von 300 pmol eingesetzt wurden. Der Ablauf des Versuches wurde nicht verändert.

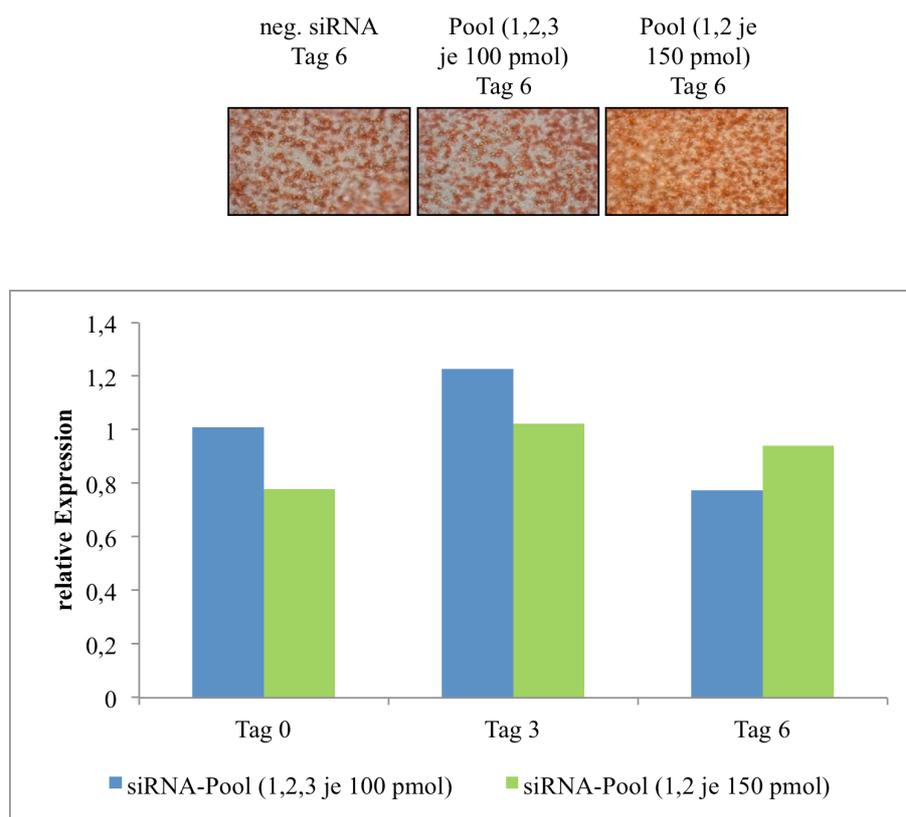


Abbildung 13: Expression des GIPR an den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung. Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000-Reagenz direkt vor Induktion, Inkubation für sechs Stunden mit neg. siRNA, siRNA1, siRNA2 und siRNA3, jeweils in einer Gesamtmenge von 300 pmol in unterschiedlicher Zusammenstellung. Die Expression ist dargestellt in Relation zur Expression in der Negativkontrolle (300 pmol). Darüber sind Mikroskopiebilder der dazugehörigen Zellen an Tag 6 in 40x-Vergrößerung zu sehen nach Färbung mit Oil Red O zur Veranschaulichung des Lipidgehaltes der Zellen (n=1).

Zur deutlicheren Darstellung der Lipidakkumulation wurden die Proben parallel zur Messung der Rezeptorexpression mit Oil Red O behandelt. Das Ergebnis der Oil Red O-Färbung ist mit repräsentativen Fotos zu den Proben an Tag 6 exemplarisch dargestellt.

In Abbildung 13 ist erkennbar, dass auch hier die gepoolte Verwendung der siRNA keine Veränderung in der GIPR-Expression induziert. Einzig liegt eine etwas geringere Expression in den siRNA-Proben an Tag 6 vor. Es ist außerdem zu erkennen, dass alle Proben nach Färbung vergleichbar gerötet sind, somit eine gleichartige Fetteinlagerung in den Zellen nach unterschiedlichem Gebrauch der siRNA vorliegt und kein Differenzierungsdefizit nachzuweisen ist.

In Abbildung 14 ist eine Versuchsreihe bestehend aus drei unabhängigen Wiederholungen dargestellt, mit der durch Optimierung der Parameter eine quantitative Manipulation des GIPR erreicht werden sollte. Es wurden drei verschiedene siRNA verwendet, die je in einer Menge von 100 pmol eingesetzt wurden.

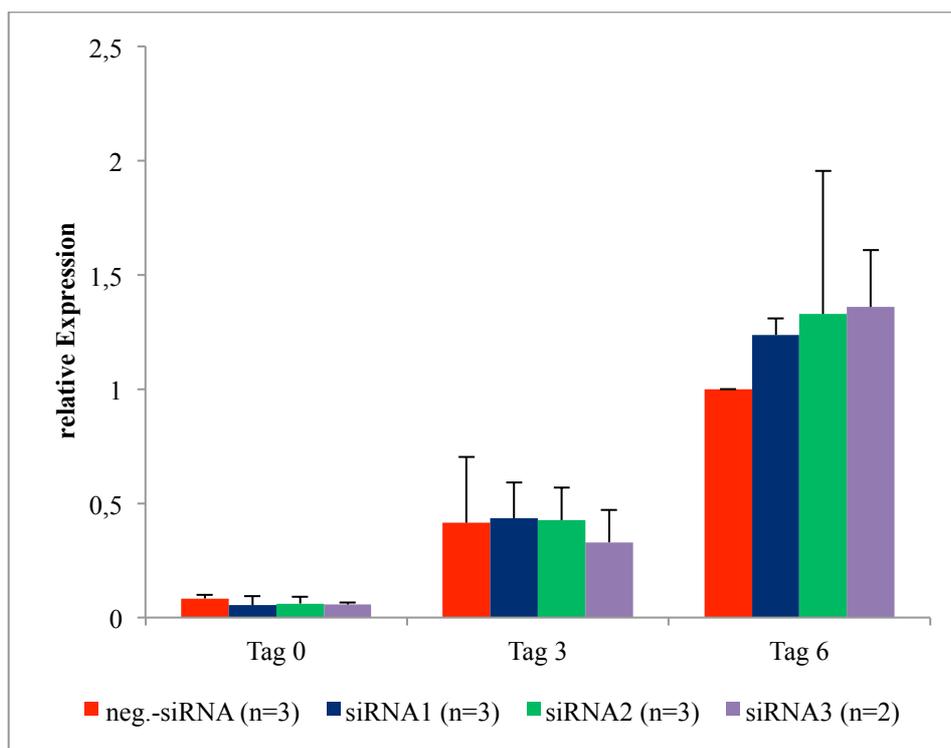


Abbildung 14: Expression des GIPR an den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung nach transientem *Knock-down*. Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000-Reagenz direkt vor Induktion, Inkubation für fünf Stunden mit neg. siRNA, siRNA1, siRNA2 und siRNA3, jeweils 100 pmol. Der Versuch ist mit den siRNA1 und 2 dreimal und mit der siRNA3 zweimal durchgeführt worden. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Expression ist dargestellt in Relation zur Expression in der Negativkontrolle an Tag 6 (n=3; für siRNA3 n=2).

Aus Abbildung 14 wird deutlich, dass sich Effekte, die bei einzelnen Versuchen unter Umständen zu sehen waren, bei Replikation relativieren. An allen Tagen sind in allen Proben vergleichbare Expressionsmuster vorhanden, es ist kein signifikanter *Knock-down* des GIPR zu messen.

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung der transienten RNA Interferenz keine Beeinträchtigung des adipozytären GIPR-Systems erreicht werden. Nach mehrfacher Optimierung der verschiedenen Variablen scheint dieser Ansatz nicht bestmöglich, um die Frage nach einem direkten Einfluss des GIPR auf die Adipozytendifferenzierung und Fetteinlagerung zu beantworten.

V.5. Verwendung von shRNA zum stabilen *Knock-down* des GIPR in Wildtypzellen

Neben der transienten Genblockierung bietet die Verwendung von *short hairpin RNA* (shRNA) die Möglichkeit, ein Gen dauerhaft zu hemmen. Durch Transfektion der shRNA in Wildtypzellen konnten Zelllinien erstellt werden, in denen die GIPR-Expression während der gesamten Differenzierung herabreguliert ist. Es wurden mehrere Konstrukte entworfen und getestet, einige mit der GIPR-mRNA als Zielsequenz und eine, die keine Zielsequenz aufwies und als Negativkontrolle verwendet wurde. Die Wildtypzellen dienten als basale Kontrolle, um unspezifische, allgemeine Auswirkungen der RNA Interferenz auf die Rezeptorexpression zu erkennen und ggf. von spezifischen Effekten trennen zu können.

V.5.1. GIPR-Expression

In Abbildung 15 ist die GIPR-Expression an den Tagen 0, 3 und 6 der Differenzierung gezeigt. Die Expression wurde jeweils in Relation zur Expression in der Negativprobe an Tag 6 gesetzt. Zur stabilen Expressionshemmung wurden verschiedene *short-hairpin*-Konstrukte verwendet und getestet, in Abbildung 15 sind die Zelllinien shRNA1 bis shRNA4, Wildtypzellen und die Negativkontrolle zu sehen.

Aus Abbildung 15 geht hervor, mit welchen shRNA eine Expressionshemmung des GIPR erzielt werden konnte. Die Expression in der Kontrollprobe ist an allen Tagen etwas stärker ausgeprägt als in der Wildtypkontrolle, die mit keinem Konstrukt transfiziert worden ist. In den Proben shRNA1 und shRNA2 sind an allen drei Tagen deutlich geringere mRNA-Spiegel als in den Kontrollen zu messen; ein hoch signifikanter Unterschied zeigt sich an Tag 0 für shRNA2 im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Unterschied von shRNA1 und shRNA2 zur Negativkontrolle an den Zeitpunkten Tag 3 und 6 ist ebenfalls hoch signifikant. Ein hoch signifikanter Unterschied errechnet sich weiterhin für die shRNA3-Probe an Tag 6, wobei an Tag 3 kein Unterschied zu erkennen ist, bedingt durch variable Messwerte. Mit dem shRNA4-Konstrukt wird kein konsistenter *Knock-down* erzielt;

es liegen die Messwerte an Tag 6 bedingt durch einen Ausreißer weit auseinander. Wegen der differenzierungsabhängig zunehmenden Rezeptorexpression (siehe auch Abbildung 9) nehmen die GIPR-mRNA-Mengen in allen Proben während der Adipogenese zu.

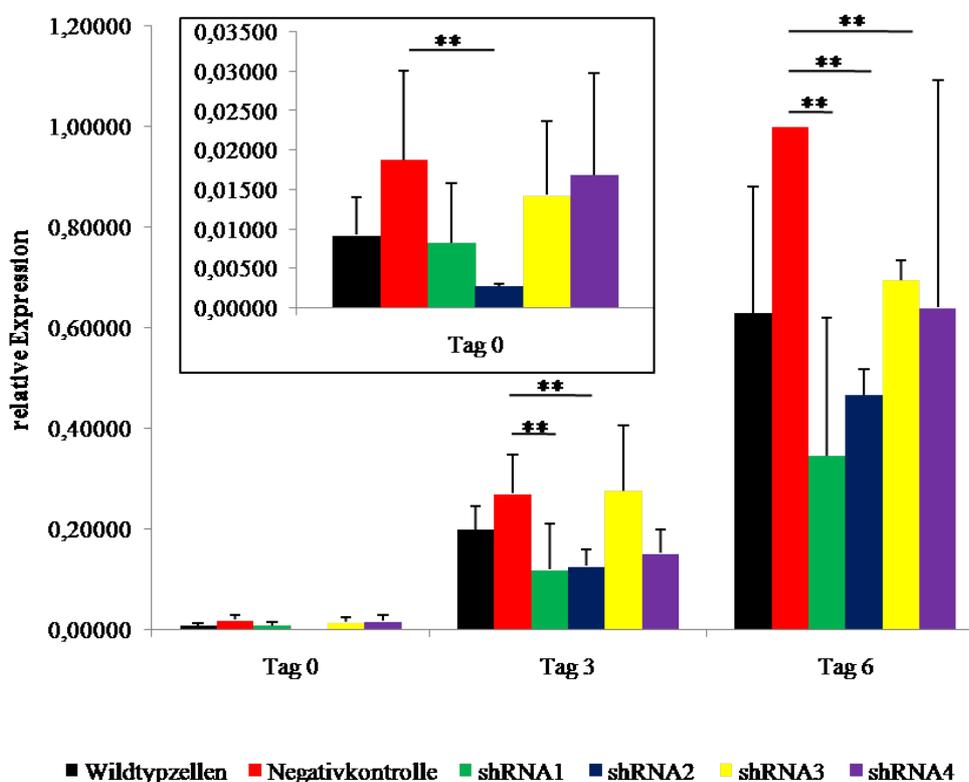


Abbildung 15: Stabiler *Knock-down* des GIPR an den Tagen 0,3 und 6. Verwendet wurden verschiedene Konstrukte gegen GIPR-mRNA (shRNA1, shRNA2, shRNA3, shRNA3) und shRNA ohne Zielsequenz als Kontrolle (Negativkontrolle), parallel wurden Wildtypzellen als weitere Kontrolle mitgeführt. Dargestellt ist die jeweilige Rezeptorexpression in Relation zur Expression in der Negativkontrolle an Tag 6, außerdem sind die Standardabweichungen gezeigt. Für Wildtypzellen, shRNA2, shRNA3 und shRNA4 wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt; für die Negativkontrolle und shRNA1 wurden sechs unabhängige Versuche durchgeführt. Unterschiede von statistisch hoher Signifikanz sind mit ** markiert. Die Expression an Tag 0 wurde zur besseren Veranschaulichung in dem Diagramm hervorgehoben.

V.5.2. Auswirkung auf die Lipidakkumulation

Um die Auswirkung eines stabilen *Knock-downs* des GIPR auf die Lipidakkumulation mittels Oil-Red-O-Färbung zu untersuchen, wurden die shRNA-Konstrukte verwendet, die bei den vorangegangenen Expressionsanalysen die effektivste Rezeptorsupprimierung bewirkten (shRNA1 und shRNA2). In Abbildung 16 ist exemplarisch einer von drei Versuchsdurchläufen gezeigt.

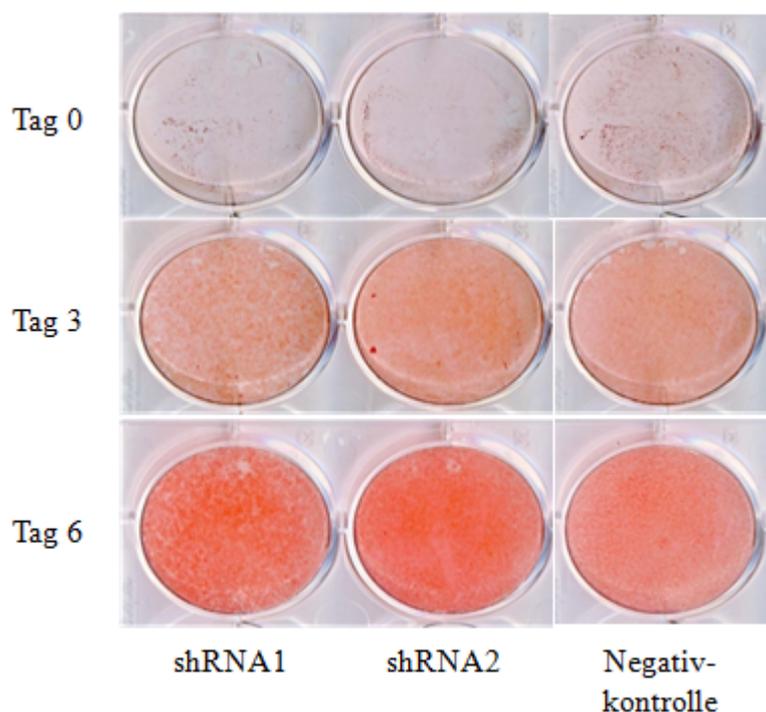


Abbildung 16: *Knock-down* des GIPR mit shRNA1 und shRNA2 hat keinen Einfluss auf die Lipideinlagerung. An den Tagen 0, 3 und 6 sind die Zellen der Proben shRNA1 und shRNA2 und der Negativkontrolle mit Oil Red O gefärbt worden, um den Lipidgehalt darzustellen. Zur Darstellung kommen Ausschnitte aus Fotografien der 6Well-Schalen.

In Abbildung 16 wird deutlich, dass es keinerlei Unterschied in dem Fetteinlagerungsverhalten der Proben gibt. Die Färbung ist in allen Proben an allen Zeitpunkten homogen verteilt, so dass von einem vergleichbaren Lipidgehalt ausgegangen werden kann. Dieser Eindruck wird durch eine densitometrische Auswertung nach Auswaschen des Farbstoffes bestätigt (Abbildung 17).

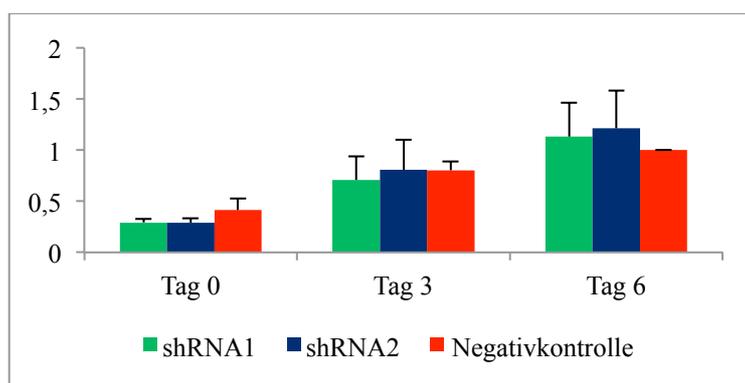


Abbildung 17: *Knock-down* des GIPR mit shRNA1 und shRNA2 hat keinen Einfluss auf die Lipideinlagerung. An den Tagen 0, 3 und 6 sind die Zellen der Proben shRNA1 und shRNA2 und der Negativkontrolle mit Oil Red O gefärbt worden und anschließend densitometrisch ausgewertet worden (n=3).

Werden die Zellen inkubiert, erhalten diese nach Erreichen der Konfluenz das Induktionsmedium, das zusätzlich IBMX, Dexamethason und Indometacin enthält. Diese Zugabe wird verwendet, um die Differenzierung zu initiieren. Damit ausgeschlossen werden kann, dass die Herabregulation des GIPR mittels RNA Interferenz die zelluläre Fetteinlagerung zwar beeinträchtigt, dies aber wegen eines starken Induktionsstimulus durch die einzelnen Mediumbestandteile unbemerkt bleibt, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Die Zellen wurden gleichsam nach Standardprotokoll behandelt, zusätzlich wurden parallele Proben mit einem abgeändertem Induktionsmedium behandelt. Es wurde jeweils ein Bestandteil des Induktionsmediums weggelassen, so dass vier verschiedene Medien verwendet wurden: Entweder das Standardinduktionsmedium, Induktionsmedium ohne Indomethacin, ohne IBMX oder ohne Dexamethason. Es wurden Wildtypzellen, die Negativkontrollzelllinie und die Zelllinien shRNA1, shRNA3 und shRNA4 mit dem GIPR als Zielsequenz enthielten, verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen (siehe nächste Seite).

An Tag 0 ist erwartungsgemäß keine Aussage zu treffen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine relevante Fetteinlagerung eingetreten ist. An Tag 3 und Tag 6 ist im Probenvergleich pro Mediumbedingung kein Unterschied zu erkennen bei „Induktionsmedium ohne Dexamethason“ und „Induktionsmedium ohne IBMX“. Bei Verwendung des kompletten Induktionsmediums und bei Weglassen von Indomethacin weist die Probe shRNA4 eine geringere Farbstoffaufnahme auf als die anderen Proben. Die geringere Färbung von shRNA4 ist insbesondere an Tag 6 für „Induktionsmedium ohne Indomethacin“ zu erkennen. Für dieselbe Bedingung weist im Gegensatz dazu die Probe sh.GIPR.4 eine etwas stärkere Färbung auf.

In Abbildung 18 ist nur ein Versuchsdurchlauf gezeigt, bei Replikation wiederholt sich das für shRNA4 an Tag 6 („Induktionsmedium ohne Indomethacin“) beschriebene Phänomen.

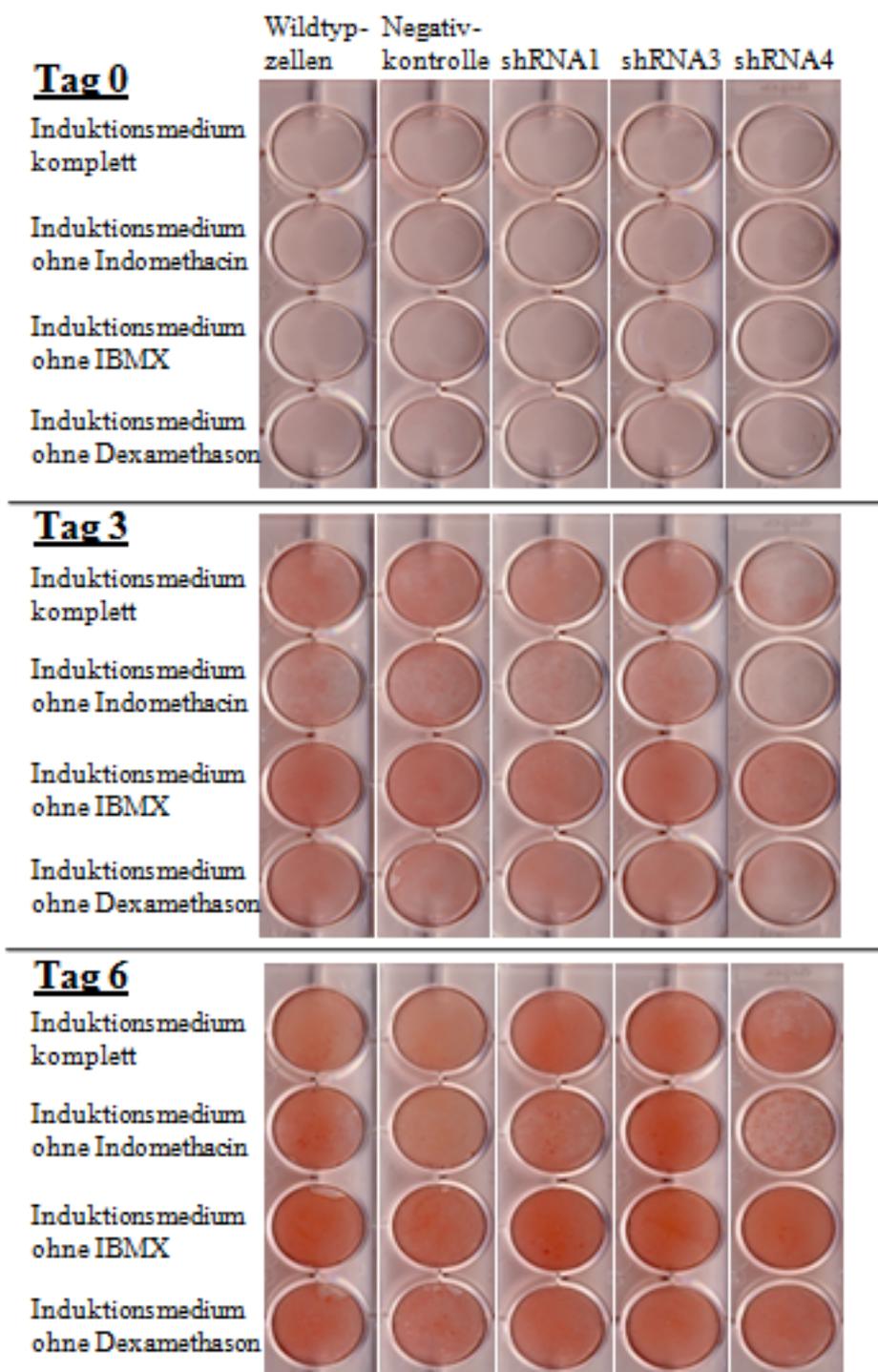


Abbildung 18: *Knock-down* des GIPR mit shRNA1, shRNA3 und shRNA4 hat keinen eindeutigen Effekt auf die Lipideinlagerung. An den Tagen 0, 3 und 6 sind die Zellen der Proben shRNA1, shRNA3 und shRNA4, der Negativkontrollen und Wildtypzellen mit Oil Red O gefärbt worden, um den Lipidgehalt darzustellen. Zur Darstellung kommen Ausschnitte aus Fotografien der 6Well-Schalen. Zur besseren Unterscheidung des Differenzierungsverhaltens wurden verschiedene Induktionsmedien verwendet: Jeweils in der ersten Zeile das Standardmedium, dann von oben nach unten Induktionsmedium ohne Indomethacin, ohne IBMX und ohne Dexamethason.

Im weiteren Verlauf wurde mittels Densitometrie eine Quantifizierung der Farbdichte vorgenommen, um einen Unterschied zwischen den Proben besser erkennen zu können; das Ergebnis für die Bedingungen „komplettes Induktionsmedium“ (oben) und „Induktionsmedium ohne Indomethacin“ (unten) ist in Abbildung 19 zu sehen. Die Zelllinie shRNA2 wurde nur mit dem kompletten Induktionsmedium inkubiert.

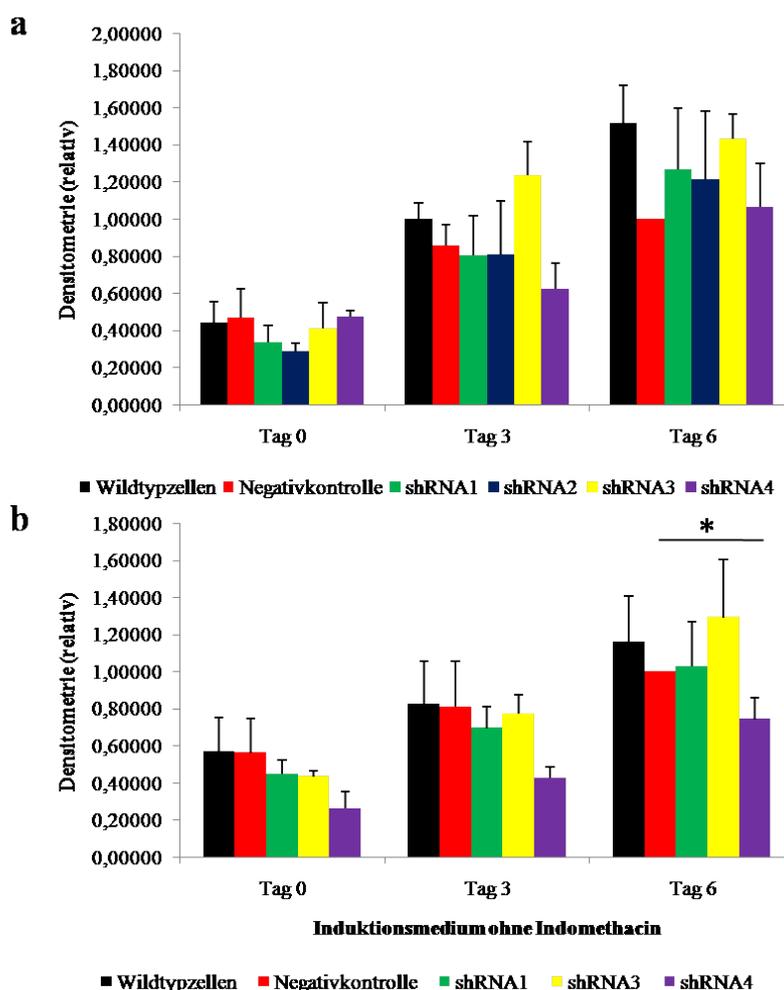


Abbildung 19: Quantifizierung des Einflusses des GIPR-Knock-down auf die Lipidakkumulation (n=3).

Abbildung 19 a: Dargestellt ist die densitometrische Auswertung des Oil Red O-Gehalts nach Färbung der Proben shRNA1, shRNA2, shRNA3 und shRNA4, der Negativkontrollen und Wildtypzellen (siehe dazu auch Abbildung 16 und Abbildung 18). Die Proben wurden mit dem kompletten Induktionsmedium inkubiert. Für das Balkendiagramm wurden Mittelwerte mit Standardabweichung verwendet, für die Negativkontrolle und shRNA4 liegen sechs unabhängige Versuche vor (n=6), für die restlichen Proben drei Versuche (n=3).

Abbildung 19 b: Dargestellt ist die densitometrische Auswertung des Oil Red O-Gehalts nach Färbung der Proben shRNA1, shRNA3 und shRNA4, der Negativkontrollen und Wildtypzellen (siehe dazu auch Abbildung 16 und Abbildung 18). Die Proben wurden mit dem Induktionsmedium ohne Indomethacin inkubiert. Für das Balkendiagramm wurden Mittelwerte mit Standardabweichung verwendet, für alle Proben liegen drei unabhängige Versuche vor (n=3).

Bei der Verwendung des kompletten Induktionsmediums sind auch nach Densitometrie keine relevanten Unterschiede in Bezug auf die Fetteinlagerung zu erkennen. Man sieht in Abbildung 19 a, gerade bei Beachtung der Fehlerbalken, ein homogenes Muster, außer dass an Tag 3 shRNA3 etwa 0,4mal mehr und shRNA4 etwa 0,2mal weniger Farbstoffgehalt aufweisen. An Tag 6 sind diese Unterschiede jedoch nicht mehr zu sehen. Bei der Auswertung der Proben, die das Induktionsmedium ohne Indomethacin erhalten haben, zeigt sich für shRNA4 ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den weiteren. In shRNA4 ist weniger Farbstoffgehalt als in den Vergleichsproben enthalten, dieser Unterschied ist für Tag 6 im Vergleich zu Negativkontrolle statistisch signifikant. Somit bestätigt sich der makroskopische Eindruck aus Abbildung 18, dass eine geringere Färbung für shRNA4 an Tag 6 bei Weglassen von Indomethacin vorliegt, auch in der Densitometrie.

V.5.3. Auswirkung auf die adipozytären Differenzierungsmarker Pref1, PPAR γ und aP2

Um weiter nach einer Auswirkung des *GIPR-Knock-down* auf die adipozytäre Differenzierung zu forschen, wurde die Bestimmung von Differenzierungsmarkern herangezogen. Die im bisherigen Abschnitt bereits erläuterten Proben wurden zur Bestimmung von Pref1, PPAR γ und aP2 verwendet.

Pref1 kommt als Präadipozyten-Faktor v.a. in frühen Differenzierungsstadien vor und hat einen hemmenden Einfluss auf die adipozytäre Reifung. PPAR γ gehört zu einer nukleären Hormonrezeptorfamilie und wird als spezifisch für Adipozyten angesehen. PPAR γ nimmt eine kritische Rolle in der Induktion der Adipogenese und Aufrechterhaltung des Adipozytenphänotyps ein. Der Marker aP2 ist ein fettsäurebindendes Protein, das selbst von der PPAR-Familie induziert wird; daher ist aP2 ebenfalls bevorzugt in reifen Adipozyten nachzuweisen.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Bestimmung von Pref1, PPAR γ und aP2 zu sehen. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die mRNA-Menge der jeweiligen Marker bestimmt. Es wurden die Proben Wildtypzellen, Negativkontrolle und die Proben shRNA1 und shRNA3 verwendet. Die Expression ist analog zu den bisherigen Versuchen in Relation zur Negativkontrolle an Tag 6 angegeben.

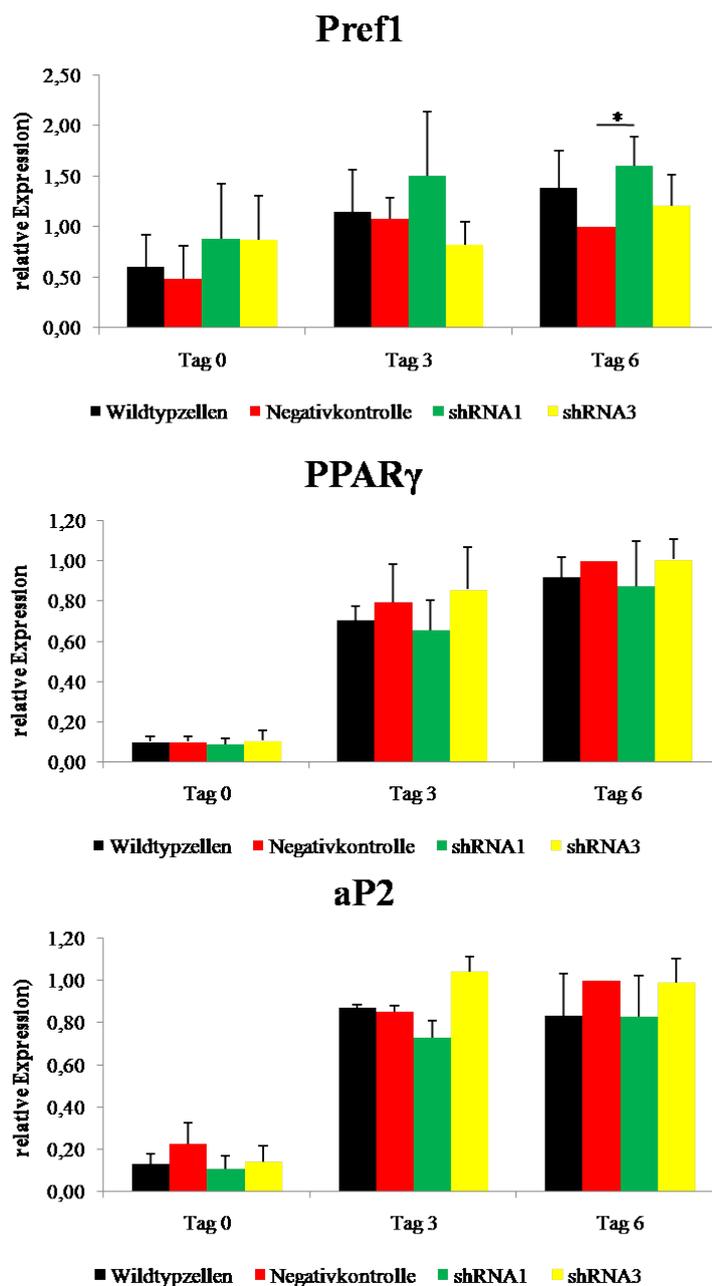


Abbildung 20: GIPR-Knock-down hat keine Auswirkung auf die Expression von Pref1 (a), PPAR γ (b) und aP2 (c). Die mRNA-Menge von Pref1 (a), PPAR γ (b) und aP2 (c) ist in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle an Tag 6 dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen (n=3).

Abschnitt a der Abbildung 20 zeigt die Expression von Pref1. An Tag 0 ist die Expression in den Proben mit Ziel-shRNA etwas geringer als in der Wildtyp- und Kontrollprobe. An Tag 3 ist für shRNA1 eine ca. 1,4mal höhere und für shRNA3 eine ca. 0,8mal geringere Expression als bei den Kontrollen zu messen. An Tag 6 wird eine signifikant höhere Expression bei shRNA1 und eine

1,2mal höhere Expression bei shRNA3 als bei sh.contr1 gemessen; der Unterschied zu Wildtypzellen fällt geringer aus.

Bei der Bestimmung von PPAR γ (Abschnitt b) ähnelt sich der Verlauf aller Proben. An Tag 0 ist insgesamt eine sehr geringe Expression zu sehen, welche an Tag 3 und Tag 6 stark zunimmt. In shRNA1 ist an Tag 3 und 6 stets eine etwas geringere Expression als in sh.contr1 zu messen.

In Abschnitt c ist die Bestimmung von aP2 zu sehen. Hier sind keine auffälligen Unterschiede zu erkennen. An Tag 0 ist in der Negativkontrolle eine doppelt so hohe Expression zu messen wie in den anderen Proben an Tag 0. In Probe shRNA3 ist an Tag 3 eine stärkere Expression als in den anderen Proben zu messen. Für shRNA1 fallen an Tag 3 und 6 jeweils leicht geringere mRNA-Mengen auf. Des Weiteren sind keine deutlichen Unterschiede in der Expression der Differenzierungsmarker zu erkennen.

Für shRNA4 wurde bei der Oil-Red-O-Färbung im Vorversuch eine signifikant geringere Fetteinlagerung an Tag 6 gemessen. Bei Auswertung der Differenzierungsmarker in der sh.GIPR6-Probe fehlen Daten zu Tag 0 und Tag 3, so dass die Daten nicht in die Abbildung 20 aufgenommen wurden.

Abbildung 21 zeigt die Auswirkung des *Knock-downs* mit shRNA4 auf die Expression der Differenzierungsmarker PPAR γ und aP2 an Tag 6.

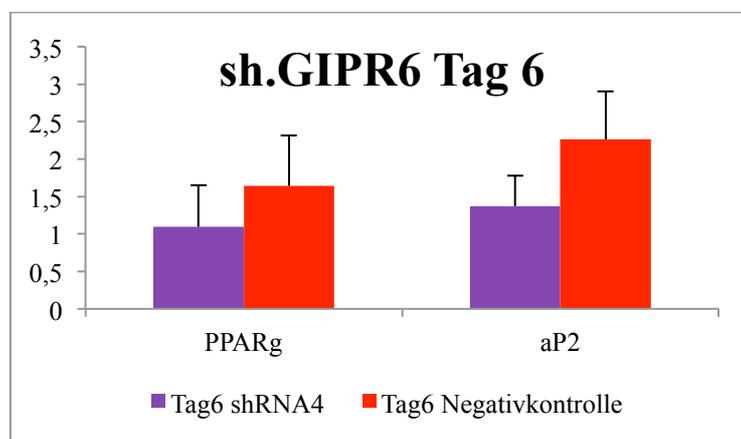


Abbildung 21: PPAR γ und aP2 in der Probe shRNA4 an Tag 6 im Vergleich zur Negativkontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

Es stellt sich dar, dass beide Differenzierungsmarker im Vergleich zur Negativkontrolle geringer exprimiert werden. Ein signifikanter Unterschied lässt sich dabei nicht errechnen.

VI. DISKUSSION

Das metabolische Syndrom gehört zu den großen Gesundheitsproblemen der westlichen Welt (Isomaa, 2003). Auch in Deutschland haben wir eine hohe Prävalenz des metabolischen Syndroms, je nach Definition werden Angaben zwischen 20 und 30% gemacht (Grundy, 2008). Dabei steht Adipositas als Risikofaktor für weitere Erkrankungen (Kopelman, 2000; Qiao *et al.*, 2007) und als wesentlicher Bestandteil des metabolischen Syndroms im Mittelpunkt des Interesses.

Auf Grundlage dieser Bedeutung wird auf dem Gebiet der Inkretine viel Forschung betrieben, um neue Therapiestrategien zu finden (Flatt, 2008; Freeman und Unger, 2008; Hoist und Lasalle, 2008; Kendall *et al.*, 2009; Lovshin und Drucker, 2009; Mudaliar und Henry, 2009; Nauck, 2009). Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere die Entdeckungen, die den GIPR betreffen, von Bedeutung. So zeigt eine Antagonisierung des Rezeptors antiadipositive Effekte (Miyawaki *et al.*, 1999; Miyawaki *et al.*, 2002; Gault *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2006; Gault *et al.*, 2007; McClean *et al.*, 2007; Fulurija *et al.*, 2008; Irwin *et al.*, 2008; McClean *et al.*, 2008; Irwin und Flatt, 2009) und GIPR-*Knock-Out*-Mäuse sind resistent gegen eine hochkalorische Diät (Yamada und Seino, 2004; Ayala *et al.*, 2008).

VI.1. Nachweis des GIPR

VI.1.1. Validierung des GIPR-*Knock-Out* in den verwendeten Zelllinien

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen einer neuen Adipozytenlinie, die aus Fettzellen von GIPR-defizienten Mäusen gewonnen wurde. Die Zellen wachsen in der *in-vitro*-Kultivierung wie gewöhnliche Wildtypzellen konfluent, fangen dann allerdings nicht an Fett einzulagern. Die Ausschaltung des Gens für den GIPR führt hier zu einer gestörten Adipogenese, einer wesentlichen Funktion der Fettzelle. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Resistenz der GIPR-*Knock-Out*-Mäuse gegen Gewichtszunahme durch periphere Effekte über das Fettgewebe vermittelt wird.

Eine weitere mögliche Ursache für das beobachtete Differenzierungsdefizit könnte im Insulinsignalweg liegen. Ein *Knock-Out* des IRS-1 zeigt ebenfalls eine Beeinträchtigung des Differenzierungsvermögens, welche durch eine IRS-1-Reexpression nahezu vollständig reversibel ist (Fasshauer *et al.*, 2001). Auch in den GIPR-KO-Zellen waren Veränderungen im Insulinsignalweg zu messen, so dass versucht wurde, das Defizit durch eine IRS-1-Überexpression wieder aufzuheben (Daten sind im Vorwege der Arbeit entstanden). Diese Überexpression konnte erfolgreich durchgeführt werden, hob jedoch das Differenzierungsdefizit nicht auf. Weder auf morphologischer noch

auf molekularer Ebene war eine Wiederherstellung zu beobachten. Ein weiterer Versuch, in dem die GIPR-KO-Zellen während der Differenzierung mit Pioglitazon stimuliert wurden (Stimulation des PPAR γ), zeigte allerdings, dass die GIPR-KO-Zellen prinzipiell in der Lage zu einer Differenzierung sind, da damit eine Lipidakkumulation zu erreichen war. Da durch die IRS-1-Reexpression in den GIPR-KO-Zellen keine Rekonstitution der Differenzierung erreicht werden konnte, wurde ein über den Insulinweg vermittelter Effekt als Ursache für das Defizit ausgeschlossen.

Zur Validierung der Beobachtung der gestörten Adipogenese der GIPR-KO-Zellen und zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem GIPR-*Knock-out* und dem Differenzierungsdefizit der Fettzellen, sollte die fehlende GIPR-Expression in den neuen Adipozytenlinien bestätigt werden.

Die durchgeführte Nachweisreaktion mittels PCR zeigt in verschiedenen Proben, dass keine Rezeptorkodierung vorliegt. Da ein Primer verwendet wurde, der die genomische DNA des GIPR detektiert, ist eine Ausbildung des Rezeptors in den Zellen ausgeschlossen.

Da bei der Verwendung von genomischer DNA weitere in der Probe enthaltene Bestandteile wie Proteine oder RNA die Reaktion beeinträchtigen könnten, ist für jede Probe ein weiterer Primer verwendet worden, um die Funktionalität der PCR zu zeigen. Für diese Positivkontrolle wurde ein Primer für den Melanocortin-4-Rezeptor verwendet, der bereits durch die Arbeitsgruppe etabliert war. Für alle vier Zelllinien konnten Banden in den Positivkontrollen dargestellt werden, was den Nachweis des fehlenden Rezeptors stützt.

Als Kontrollprobe für die hier dargestellte PCR sind inguinale Wildtypzellen herangezogen worden. Die Wildtypzellen, die für die anderen Versuche in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen aus einem epididymalen Fettzelldepot. Dieser Unterschied ist für die hier vorliegende Frage zu vernachlässigen, da der *Knock-Out* des GIPR sowohl in epididymalen als auch inguinalen Fettzellen die Fähigkeit zur Fetteinlagerung beseitigt.

VI.1.2. Validierung der GIPR-Reexpression in den GIPR-KI-Zelllinien

Analog zu dem GIPR-*Knock-out* führte der IRS-1-*Knock-out* zu einem Differenzierungsdefizit. Die Reexpression des IRS-1-Rezeptors machte das Differenzierungsvermögen vollständig reversibel (Fasshauer *et al.*, 2001). Die Reexpression des GIPR in den GIPR-*Knock-out*-Zellen führte jedoch nicht zu einer Rekonstitution der Fettzellendifferenzierung. Um sicher zu stellen, dass der Rezeptor erfolgreich in die GIPR-*Knock-out*-Zellen eingebracht werden konnte, wurde erneut mittels einer qualitativen PCR die Expression ermittelt.

Eine Detektion auf funktioneller Proteinebene war nicht möglich, da kein kommerzieller Antikörper für die Durchführung eines Western Blot zur Verfügung stand.

Als Template wurde cDNA gewählt, um die Transkription des Rezeptors in den GIPR-KI-Zelllinien nachweisen zu können. In dem pBABE-Vektor, der zur Erstellung der Zelllinie verwendet wurde, wurde der GIPR aus dem Ratten-Genom kloniert. Da keine Rattenadipozyten zur Verfügung standen, wurde die pBABE-rGIPR-Probe als Positivkontrolle verwendet. Der Primer wurde so erstellt, dass nahezu die gesamte Rezeptorsequenz detektiert wird, weshalb das Produkt die hohe Länge von 1,3 kb aufweist. Auf diese Weise ist das Vorhandensein des rGIPR in den reexprimierenden GIPR-KO-Zellen nachgewiesen worden.

Erwähnenswert bleibt, dass die Bande der Positivkontrolle deutlicher zu erkennen ist. Es wurden ungefähr 1,8 ng pBABE-rGIPR und ca. 0,4 µg cDNA für die GIPR-KI-Probe eingesetzt. Die Positivkontrolle wurde in geringerer Menge eingesetzt, weil die deutliche Bande bereits aus Vorversuchen bekannt war. Trotz dieses Mengenunterschiedes ist ein Unterschied in der Bandenintensität erkennbar. Das ist am ehesten auf die cDNA-Synthese zurückzuführen, da die cDNA mithilfe von Random-Primern umgeschrieben wurde und somit die Menge der GIPR-mRNA in voller Länge deutlich geringer sein wird als die eingesetzte Gesamtmenge. Zwar ist die verwendete Superscript Reverse Transkriptase laut Herstellerangabe für eine cDNA-Länge von 12,3 kb geeignet, dennoch sind zusätzlich zum randomisierten Primerannealing unterschiedlich häufig vorkommende Syntheseabbrüche während der Umschreibung als Ursache für die geringer angefärbte Bande wahrscheinlich.

Es ist für die Wildtypzellen kein PCR-Produkt zu erhalten, da aufgrund einer geringen Sequenzhomologie des Maus- und des Ratten-GIPR der verwendete Primer dafür nicht geeignet ist. Eine erhaltene Bande bei Wildtypzellen wäre in diesem Kontext eher ein Hinweis auf ein unspezifisches Ergebnis. Somit unterstützen die fehlenden Banden für Wildtypzellen und der Wasserkontrolle das Ergebnis.

Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers konnte die Funktion des Rezeptors auf Proteinebene nicht überprüft werden. Ein solches Experiment hätte neben der Transkription auch die Translation des Rezeptors beweisen können. In Ergänzung dazu wäre ein funktioneller Test optimal. Die Versuche dieser Arbeit konzentrierten sich jedoch überwiegend auf die Anwendung der RNA Interferenz als Methode zur Blockierung des GIPR.

VI.1.3. Bestimmung des GIPR-Expressionsprofils in Wildtypzellen während der Adipogenese

Wie sich die Expression des GIPR während der Differenzierung verhält, ist ein wesentlicher Punkt bei der Erforschung des GIPR und der Beeinflussung der Adipogenese. Anhand einer quantitativen

PCR konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Expression des Rezeptors während der Differenzierung zunimmt.

Der GIPR wird ab dem Zeitpunkt der Induktion zunehmend ausgebildet und liegt in vollständig differenzierten Adipozyten in einer höheren Menge vor. Die Adipozyten an Tag 6 enthalten intrazellulär fast 900mal so viel GIPR-mRNA wie Tag 0-Adipozyten. Die differenzierungsabhängige Expression wurde bereits für 3T3-Adipozyten in der Literatur beschrieben (Yip *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2007). In der Publikation von Song wurde der größte Zuwachs der Rezeptorexpression in frühen Stadien der Differenzierung beschrieben; so wurde eine Verdopplung des GIPR bereits 30 Minuten nach Induktion von 3T3-Adipozyten gezeigt. Ähnliches konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, nur dass hier der Zuwachs der intrazellulären Menge deutlicher zwischen Tag 3 und Tag 6 mit einem 48fachen Anstieg ist als am Anfang der Differenzierung (im Mittel 18,6facher Anstieg von Tag 0 zu Tag 3).

Diese Ergebnisse sind nicht uneingeschränkt miteinander zu vergleichen, da in der zitierten Publikation der Nachweis auf Proteinebene erbracht wurde. Die dafür verwendeten Antikörper waren nicht kommerziell verfügbar und es waren keine reproduzierbaren Informationen über Herkunft und Produktion zu erhalten.

Die Annahme, dass die Adipogenese durch den GIPR beeinflusst wird, wird durch die zunehmende Transkription des GIPR während der Differenzierung unterstützt. Alle wichtigen Faktoren, die die Adipogenese positiv beeinflussen, werden in einer differenzierungsabhängigen Weise exprimiert. Als prominente Beispiele sind hier v.a. der Insulinsignalweg, PPAR γ und GLUT4 zu nennen (Tontonoz *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998; Fasshauer *et al.*, 2001).

Die quantitative PCR ist als Methode zum Nachweis der differenzierungsabhängigen Expression sehr gut verwertbar. Als relativer Bezugspunkt wurde die Expression von 36B4 gewählt, dieses Gen dient als sogenanntes Haushaltsgen, da es in konstanter Menge in den Adipozyten vorkommt und nicht durch Differenzierung oder Stimulation verändert wird. 36B4 ist ein ribosomales Phosphoprotein und als Vergleichsgen durch die Arbeitsgruppe und auch in der Literatur gut etabliert (Perwitz *et al.*, 2006; Akamine *et al.*, 2007; Mauser *et al.*, 2007; Perwitz, 2008; Westphal *et al.*, 2008).

VI.2. Knock-down des GIPR

Erst 2001 wurde die RNA Interferenz als eine neue Methode eingeführt, auch in Säugetierzellenspezifische Untersuchungen durchzuführen (Elbashir *et al.*, 2001a). Inzwischen wird die RNA Interferenz als eine geeignete Methode angesehen, um Genfunktionen in physiologischen und pa-

thologischen Situationen zu überprüfen und eine systematische Analyse der Genexpressionen umzusetzen (Dykhhoorn *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2005).

VI.2.1. Transiente Hemmung der GIPR-Expression

Zu Beginn dieser Arbeit fanden sich in der Literatur nur wenige Beispiele für die Anwendung von siRNA in Adipozyten oder zur Beeinflussung des GIPR. Viele Publikationen sind erst während der Durchführung der Experimente veröffentlicht worden und haben diese in unterschiedlichem Maße beeinflusst.

Es sprach viel für die Verwendung von siRNA: Sie konnten fertig synthetisiert und bereits getestet und validiert bezogen werden, wodurch ein sofortiger Einsatz dieser Methode möglich war. Außerdem wurden bis dato effizientere Transfektionsergebnisse mit siRNA als mit plasmidbasierten Techniken erreicht (Dykhhoorn *et al.*, 2003).

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Effizienz der Transfektion, insbesondere sind dabei Zelltyp, Konfluenz und die Transfektionstechnik von Bedeutung. Der Erfolg der Gensuppression unterscheidet sich deutlich und hängt von Zelltyp und Umsatz des zu supprimierenden Proteins ab. Im Durchschnitt kann davon ausgegangen werden, dass das Signal drei bis fünf Zellteilungen übersteht und nach sieben bis zehn Teilungen wieder das normale Ausmaß erreicht hat. Für die meisten Zelltypen folgt daraus eine Gensuppression, die ca. drei bis fünf Tage stabil ist (McManus und Sharp, 2002).

Die für diese Arbeit kultivierten Adipozyten fangen ab der Induktion an Fett zu akkumulieren, was als wichtigstes Zeichen einer intakten Differenzierung gewertet wird. Somit muss die Transfektion bereits vor Induktion durchgeführt werden, um die Signalverarbeitung über den GIPR wenigstens bis Tag 3 zu beeinflussen. Häufig verwendete Methoden sind Elektroporation und Lipofektion, welche auch für diese Arbeit angewendet wurden. Lipofektion wird jedoch nicht für Adipozyten, sondern nur für Präadipozyten empfohlen, da intrazelluläre Lipide die Transfektion stören könnten. Das ist ein weiterer Grund für eine frühe Transfektion.

Zunächst wurde die Technik der Elektroporation angewendet. Das Amaxa® Nucleofector® Set bietet eine Abstimmung von Parametern für den Stromimpuls und dem Transfektionsreagenz, die laut Hersteller für Präadipozyten geeignet ist. Elektroporation wurde bereits häufig und erfolgreich in Adipozyten angewendet (Jiang *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Puri *et al.*, 2007; Zaragosi *et al.*, 2007; Shimba, 2008).

Abbildung 10 bis Abbildung 11 zeigen exemplarisch, dass mittels Amaxa® Nucleofector® und Qiagen-siRNA keine ausreichend lange GIPR-Expressionsreduktion zu erreichen war. Mit 100 pmol ist ein *Knock-down* im Vergleich zu neg. siRNA bis 72 Stunden nach Transfektion zu errei-

chen. In dem Diagramm ist die relative Expression dargestellt, so dass die Expression der Negativkontrolle nicht direkt abzulesen ist. Es fällt bei der Analyse jedoch auf, dass die GIPR-Expression auch in den neg. siRNA-Kontrollen im Vergleich zu der Expression in Wildtypzellen geringer ist, bis sie im Verlauf der Differenzierung (Tag 4) wieder ein „normales“ Maß erreicht hat. Dies könnten Zeichen eines unspezifischen *Knock-downs* im Sinne einer allgemeinen Transkriptionsreduktion als Folge der siRNA oder im Sinne einer Aktivierung der Interferonabwehr der Zellen sein, was beispielsweise in humanen Nierenzellen berichtet wurde (Kariko *et al.*, 2004).

Bei der Erhöhung der siRNA-Menge auf 200 pmol erhält man ein anderes Expressionsmuster. Ein *Knock-down*-Signal scheint allenthalben 48 Stunden stabil, die Expression ist aber in der Kontroll-siRNA erst höher, dann niedriger als in Wildtypzellen (nicht dargestellt). Man könnte die erhöhte Expression des GIPR in der Kontrolle als Zeichen eines unspezifischen Nebeneffektes verstehen, da eine Aktivierung des Interferonsystems auch zu einer Geninduktion führen kann (Sledz *et al.*, 2003; Sledz und Williams, 2004). Es fehlt für eine bessere Interpretation aber die Auswertung des Tag 0, außerdem wäre zur Beurteilung der allgemeinen Genexpression der Zelle eine Analyse weiterer Gene hilfreich.

Die Anwendung einer weiteren siRNA (siehe Abbildung 11), die nach Herstellerangaben an einer anderen Lokalisation der mRNA bindet und einen anderen Basengehalt aufweist, hat keinen effektiven *Knock-down* hervorgebracht. In der Abbildung ist ein Abgleich zur neg. siRNA gewählt und ebenfalls die Expression in den Wildtypkontrollen dargestellt. Es wird deutlich, dass in den Wildtypzellen (Kontakt mit dem Transfektionsreagenz, jedoch ohne siRNA) die GIPR-Expression höher als in der Negativkontrolle und in der siRNA2-Probe etwa gleich stark ausgebildet ist. Die Anwendung des Transfektionsreagenz ohne siRNA bei den Wildtypen weist nicht auf eine toxische Nebenwirkung oder eine Reduktion des allgemeinen Expressionsaktivität der Zellen hin, da tendenziell in diesen Zellen eine höhere Expression des GIPR gemessen wird. Interessanterweise ist jedoch die Expression des GIPR in den Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transifiziert wurden, geringer als in der Wildtypkontrolle, was eine unspezifische Expressionshemmung durch die zellfremden RNA-Fragmente vermuten lässt.

Diese deutlich unterschiedlichen Expressionsmuster in den ersten siRNA-Versuchen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gedeutet werden. Dazu kommt, dass die Verwendung der Elektroporation zu einem ausgeprägten Zellsterben führt, weshalb es z.T. zu einer Verlängerung der Präadipozytenphase bis zur Induktion kam. Durch das Zellsterben dauerte es also länger bis eine vollständige Konfluenz der Zellen in der Kulturschale erreicht war; dadurch kam es einerseits zu einer Störung der Zelldifferenzierung und andererseits zu einer Verkürzung der potentiellen *Knock-down*-Zeit in Adipozyten nach Induktion. Aufgrund dieses negativen Einflusses der Elektroporation auf die Differenzierung der Zellen und der unregelmäßigen GIPR-Expression nach Transfektion wurde

diese Methode nicht weiter verfolgt. Wegen des hohen Zellsterbens wird in der aktuellen Literatur die Elektroporation inzwischen nicht mehr als Methode der ersten Wahl angesehen (Shimba, 2008).

Lipofectamine™ 2000 wird häufig als Transfektionsmethode verwendet. Auch in Adipozyten wurde dieses Reagenz bereits angewendet (Katome *et al.*, 2003). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellen nicht von der Kulturplatte gelöst werden müssen. Es kann daher der Eingriff in das Differenzierungsprotokoll geringgehalten werden und es kommt beispielsweise nicht zu einer Verlängerung bzw. Verzögerung der Fettzellendifferenzierung. Auch hierbei wurde als Zeitpunkt der Transfektion das Präadipozytenstadium gewählt.

Der erste Lipofectamine-Versuch konnte keinen andauernden *Knock-down* erzielen (siehe Abbildung 12). Mit siRNA2 ist an Tag 0 eine zwar geringere Expression des GIPR zu messen, aber an Tag 3 ist dieser Effekt nicht mehr zu erkennen. Trotz der unterschiedlichen Rezeptorexpression ist kein Unterschied im Differenzierungsverhalten zu erkennen, an Tag 3 weisen alle Zellen eine vergleichbare Mikroskopie auf.

Es wurde in der Literatur darüber berichtet, dass auch mehrere siRNA für einen effizienten *Knock-down* verwendet werden können (Zhou *et al.*, 2004). Dieses Pooling von verschiedenen siRNA wurde auch im Rahmen dieser Arbeit getestet. Es wurden drei siRNA verwendet, mit denen insgesamt 300 pmol in die Präadipozyten transfiziert wurden (siehe Abbildung 13). Dabei wurden in ersten Versuchen kaum Unterschiede zwischen den Proben gemessen. Die Expression des GIPR und auch die Lipidakkumulation sind homogen. Somit wurde dieser Ansatz nicht weiter verwendet.

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen keinen Schluss über das effektivste Verfahren zum *Knock-down* des GIPR in Adipozyten zu, da keine Trends zu erkennen sind. Lipofectamine scheint das Verfahren zu sein, welches im Gegensatz zur Elektroporation mit Amaxa® Nucleofector® die Differenzierung der Adipozyten am wenigsten stört. Außerdem scheint das Verwenden mehrerer siRNA in einer Probe keinen Erfolg zu bringen. Da eine hohe Menge von siRNA toxische Effekte haben kann und parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Klein gezeigt haben, dass mit 100 pmol siRNA ein effektiver *Knock-down* in Adipozyten prinzipiell zu erzielen ist, wurden weitere Versuche mit 100 pmol siRNA durchgeführt.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte auch durch eine Replikation kein quantitativer Einfluss auf den GIPR gezeigt werden. Insgesamt entsteht das Bild, dass die siRNA keinen Einfluss auf die Expression haben. Statistisch ist eine von fünf siRNA effektiv (Dallas und Vlassov, 2006), so dass man an dieser Stelle für ein weiteres Bemühen mit siRNA argumentieren könnte. Auch hätte man auf siRNA anderer Hersteller ausweichen oder diese selbst herstellen können. Zu dem Zeitpunkt der Versuche war die Sequenz des GIPR jedoch nur aufgrund bioinformatischer Vorhersagen bekannt, und es wurde von verschiedenen Slicevarianten berichtet, was Auswahl und Herstellung

geeigneter siRNA erschwert hat. Ein weiterer Nachteil ist der transiente Charakter der Methoden. Da die Fetteinlagerung bereits früh nach Induktion eintritt, erscheint eine Transfektion nach Induktion nicht sinnvoll für die Suche nach einer Beeinflussung der Lipidakkumulation durch den GIPR. Hinzu kommt, dass das Signal ausreichend lange bestehen muss, da die Einlagerung des Fettes über die gesamte Differenzierung hinweg stattfindet.

VI.2.2. Stabile Hemmung der GIPR-Expression

Den Problemen des transienten Ansatzes konnte durch Erstellung stabiler *Knock-down*-Zelllinien erfolgreich begegnet werden. Durch die Verwendung von shRNA wurde sichergestellt, dass die Rezeptorexpression über die gesamte Differenzierung hinweg vermindert ist.

Wichtig für die Interpretation des GIPR-*Knock-downs* ist die Beurteilung der Differenzierungsmarker. Hierfür wurde die Bestimmung von Pref-1, PPAR γ und aP2 gewählt, die verschiedene Zeitpunkte der Differenzierung repräsentieren und einen Einfluss auf die Adipogenese zeigen können. Diese Differenzierungsmarker wurden im zweiten shRNA-Durchlauf mitbestimmt.

VI.2.3. Auswirkung der GIPR-Hemmung auf die Fettzellendifferenzierung

Messung der Rezeptor-mRNA in den Proben zeigt, dass ein *Knock-down* sehr effektiv in den Zelllinien shRNA1 und shRNA2 erreicht wurde, da diese Proben an allen Tagen signifikant weniger mRNA ausbilden als die Kontrollen (Abbildung 15). Mit dem Konstrukt shRNA3 zeigt sich an Tag 6 eine geringere GIPR-Menge. Mit shRNA4 ist an Tag 3 und 6 zwar im Mittel eine geringere Expression zu messen als in der Kontrolle, aber bedingt durch einen Ausreißer in der Messreihe an Tag 6 kommt eine große Standardabweichung zustande, so dass hier kein statistisch signifikanter *Knock-down* festzustellen ist.

Unklar ist, warum für shRNA3 an Tag 6 ein *Knock-down* zu messen ist, jedoch nicht an Tag 3. Eine unspezifische Induktion der Transkription kann als Ursache ausgeschlossen werden, da für Pref1 eine geringere mRNA-Menge gemessen wird als in der Kontrolle. Eine unspezifische Transkriptionsinduktion in dieser Zelllinie hätte auch die Pref1-mRNA-Menge im Vergleich zur Wildtypkontrolle vermehrt. Ebenso kann eine unspezifische RNA-Degradation ausgeschlossen werden, da PPAR γ und aP2 etwas stärker exprimiert werden als in der Wildtypkontrolle. So ist ein erfolgreicher *Knock-down* mit sh.GIPR4 zwar sehr wahrscheinlich, aber nicht zweifelsfrei zu zeigen.

Da mit shRNA2 auch ein *Knock-down* zu messen war, wäre eine Differenzierungsmarkerbestimmung für dieses Konstrukt an dieser Stelle wünschenswert, jedoch musste die Probenreihe aufgrund eines Pilzbefalles verworfen werden und stand für weitere Analysen nicht zur Verfügung.

Pref1 ist ein Präadipozytenmarker und somit sprechen hohe mRNA-Mengen an Tag 6 für eine Differenzierungshemmnis. Durch den *Knock-down* mit shRNA1 ist an Tag 6 eine erhöhte Menge zu messen, was auf ein Defizit in der Differenzierung hinweist. Dazu konkordant ist die Transkription von PPAR γ und aP2 leicht vermindert.

Bei der Untersuchung des Fetteinlagerungsverhaltens mittels Oil Red O-Färbung sind für die Proben shRNA1 und shRNA2 keine Unterschiede aufgefallen. Im Vergleich zu der Kontroll-shRNA ist die gleiche Aufnahme des lipidspezifischen Farbstoffes festzustellen.

Um jedoch sicherzustellen, dass eine gleichartige Fetteinlagerung nur wegen eines Stimulus aus dem Induktionsmedium zu erhalten ist, was einen etwaigen Effekt durch den *Knock-down* überlagert, wurde im zweiten shRNA-Durchlauf mit veränderten Induktionsmedien gearbeitet. Durch Weglassen jeweils eines Bestandteiles des Induktionsmediums sollte ein eventueller Unterschied aufgedeckt werden.

Bei Betrachtung der verschiedenen Induktionsbedingungen fällt für shRNA1 und shRNA3 kein Unterschied auf. Es kann festgehalten werden, dass der nachgewiesene *Knock-down* mittels shRNA1 keinen Einfluss auf die Lipidakkumulation hat. Interessanterweise ist bei shRNA4 eine verminderte Anfärbung der Proben an Tag 6 zu erkennen, wenn ohne Indomethacin induziert wird. Das bestätigt sich in der densitometrischen Auswertung. Für das Konstrukt shRNA4 konnte ein *Knock-down* nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden und die Auswertung von aP2 und PPAR γ zeigen keine signifikanten Ergebnisse. Daher scheint der Unterschied in der Fetteinlagerung einen anderen Effekt als Ursache haben. Unter Umständen hat dies einen unspezifischen Nebeneffekt zur Ursache, da theoretisch bereits sieben Nukleotide ausreichen, ein nicht beabsichtigtes Gen herabzu-regulieren (Jackson und Linsley, 2004; Scacheri *et al.*, 2004).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein erfolgreicher *Knock-down* des GIPR mit zwei verschiedenen Plasmiden erreicht werden. Dieser *Knock-down* hat keinen signifikanten Einfluss auf das Fetteinlagerungsverhalten und nur in einem Fall einen nicht signifikanten Einfluss auf die Expression der Differenzierungsmarker Pref1, PPAR γ und aP2. Somit kann ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem GIPR und der Fettzellendifferenzierung nicht gezeigt werden.

Song *et al.* berichten, dass sie durch eine Koinkubation differenzierender 3T3-Adipozyten mit GIP eine induzierte aP2-Expression erhalten und schließen daraus eine über den GIPR vermittelte Verbesserung in der Differenzierung (Song *et al.*, 2007). Gegensätzliches wird jedoch in anderen Publikationen diskutiert. So wird vermutet, dass GIP die Fettakkumulation nur in Abwesenheit von Insulin bzw. nach Hemmung des Insulinsignalweges direkt verstärkt und eine untergeordnete Rolle spielt, wenn Insulin anwesend ist (Zhou *et al.*, 2005). Dazu passend wurde bereits vor längerer Zeit gezeigt, dass die Aufnahme von Fettsäuren in Fettzellen einer Ratte durch GIP nur wenig induziert

wird, jedoch die Aufnahme unter Anwesenheit von Insulin deutlich verstärkt (Beck und Max, 1983).

Auch die hier verwendeten Adipozyten werden in Anwesenheit von Insulin differenziert, was eine Bedingung darstellt, die *in vivo* physiologisch vorzufinden ist. Daher ist abschließend nicht eindeutig zu klären, ob der GIPR einen fördernden Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung hat, wenn der Insulinsignalweg beeinträchtigt ist und ob das Weglassen von Insulin bei der Differenzierung der *Knock-down*-Zellen einen Effekt zeigen würde. Diese Arbeit kann die Hypothese nicht unterstützen, dass die Manipulation des GIPR einen hemmenden Einfluss auf die Fettzellendifferenzierung hat und dadurch ein interessantes Ziel für eine therapeutische Intervention darstellt.

VI.3. Gewonnene Erkenntnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen folgende Aussagen zu:

- 1) In den verwendeten GIPR-KO-Zellen fehlt die Information für den GIPR.
- 2) In den GIPR-reexprimierenden Zellen wird der GIPR wieder transkribiert.
- 3) Es liegt in den verwendeten Adipozyten eine differenzierungsabhängige Expression des adipozytären GIPR vor.
- 4) Für die Untersuchung von Rezeptoreinflüssen auf die Differenzierung von kultivierten Adipozyten eignen sich shRNA-Plasmide; die Anwendung eines transienten Ansatzes ist weniger geeignet.
- 5) Die Erstellung einer stabilen *Knock-down*-Zelllinie ist mit zwei Konstrukten möglich (shRNA1 und shRNA2).
- 6) Der *Knock-down* des GIPR hat keinen Einfluss auf die Fetteinlagerung in kultivierten Adipozyten.
- 7) Der *Knock-down* des GIPR verändert in der Zelllinie shRNA1 nicht signifikant die Expression von Pref-1, PPAR γ und aP2 im Sinne einer beeinträchtigten Differenzierung. In der Zelllinie shRNA2 konnten keine Veränderungen gemessen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Der *Knock-Out* des *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide* Rezeptors (GIPR) verändert die Fettzellendifferenzierung *in vivo*; GIPR-*Knock-Out*-Mäuse sind bei einer hochkalorischen Mast vor Adipositas geschützt. Untersuchungen mit *in vitro* kultivierten *Knock-Out*-Zellen zeigen, dass die Zellen das Differenzierungsvermögen verloren haben, welches durch Reexpression des GIPR nicht wiedererlangt werden kann. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob ein direkter Einfluss, vermittelt über den GIPR, für die Fetteinlagerung verantwortlich ist. Der klinische Hintergrund dieser Überlegung ist die Antagonisierung des Rezeptors als mögliches Therapeutikum gegen Adipositas.

Als Methode wurde die RNA Interferenz (RNAi) gewählt. Die RNAi ist ein natürlicher Mechanismus einer Zelle, die Genexpression posttranskriptional zu regulieren. Durch Kenntnis der mRNA-Struktur eines Gens können dafür spezifische *small interfering RNA* (siRNA) bzw. *short hairpin RNA* (shRNA) synthetisiert und eine Herabregulation dieses Gens erzielt werden. Da zu Beginn dieser Doktorarbeit die RNAi noch nicht auf das adipozytäre GIPR-System angewendet wurde, mussten zur Verfügung stehende Ansätze zunächst untersucht und überprüft werden. Initial wurden kommerzielle siRNA und zur Transfektion die Elektroporation (Transport der siRNA durch Öffnen der Zellmembranen mittels Stromimpuls) und die Lipofektion (Transport durch Bildung lipidischer Transportvesikel) verwendet. Die Elektroporation induzierte ein hohes Zellsterben und hatte einen erheblichen Einfluss auf das Differenzierungsprotokoll der Adipozyten. Auch mit der Lipofektion konnte kein erfolgreicher *Knock-down* des GIPR erreicht werden. Mit shRNA wurde ein stabiler *Knock-down* erreicht, indem die shRNA in das Genom eingebaut wurde. Nach Etablierung dieses Ansatzes auf das adipozytäre GIPR-System war es möglich zwei *Knock-down*-Zelllinien zu erstellen (shRNA1 und shRNA2).

Die Differenzierung der Fettzellen wurde nach Herabregulierung des GIPR beobachtet (allgemeiner makroskopischer Aspekt und fettspezifische Färbung mit densitometrischer Auswertung) und verschiedene adipozytäre Differenzierungsmarker (Pref1, PPAR γ und aP2) mittels RT-PCR gemessen. Es zeigte sich, dass die Lipidakkumulation in den *Knock-down*-Zelllinien nicht beeinträchtigt ist. Die Messung verschiedener adipozytärer Differenzierungsmarker ergab, dass der *Knock-down* mit shRNA1 nicht signifikante Veränderungen im Sinne einer beeinträchtigten Differenzierung erzielt (Pref1-Hochregulation in ausdifferenzierten Adipozyten, Herabregulation von aP2 und PPAR γ). In der zweiten Zelllinie, in der ein erfolgreicher *Knock-down* nachgewiesen wurde, waren diese Veränderungen nicht zu zeigen.

Zusammenfassend konnte der GIPR erfolgreich herabreguliert werden und dieses Signal über die gesamte Differenzierung stabil gehalten werden. Mittels RNA Interferenz konnten keine Hinweise auf einen direkten Effekt des GIPR auf die Adipozytendifferenzierung nachgewiesen werden.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y:** Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods* 70:481-486 (2007).
2. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J:** The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366:1059-1062 (2005).
3. **Alberti KG, Zimmet PZ:** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15:539-553 (1998).
4. **Amland PF, Jorde R, Burhol PG, Giercksky KE:** Effect of intravenously infused porcine GIP on serum insulin in obese and lean subjects studied with the hyperglycemic clamp technique. *Scand J Gastroenterol* 20:309-314 (1985).
5. **Assmann G, Guerra R, Fox G, Cullen P, Schulte H, Willett D, Grundy SM:** Harmonizing the definition of the metabolic syndrome: comparison of the criteria of the Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation in United States American and European populations. *Am J Cardiol* 99:541-548 (2007).
6. **Avram MM, Avram AS, James WD:** Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 56:472-492 (2007).
7. **Ayala JE, Bracy DP, Hansotia T, Flock G, Seino Y, Wasserman DH, Drucker DJ:** Insulin action in the double incretin receptor knockout mouse. *Diabetes* 57:288-297 (2008).
8. **Baggio LL, Drucker DJ:** Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157 (2007).
9. **Bailey CJ, Flatt PR, Kwasowski P, Powell CJ, Marks V:** Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112:224-229 (1986).
10. **Balkau B, Charles MA:** Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16:442-443 (1999).
11. **Beck B, Max JP:** Gastric inhibitory polypeptide enhancement of the insulin effect on fatty acid incorporation into adipose tissue in the rat. *Regul Pept* 7:3-8 (1983).
12. **Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT:** Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302:716-718 (1983).
13. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ:** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366 (2001).
14. **Biddinger SB, Kahn CR:** From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68:123-158 (2006).
15. **Bookout AC, CL; Mangelsdorf, DJ:** High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. *Current Protocols in Molecular Biology* 15.8.1-15.8.21:(2005).
16. **Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA, Dupre J:** Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res* 31:487-532 (1975).
17. **Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R:** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553 (2002).

18. **Buchon N, Vaury C:** RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity* 96:195-202 (2006).
19. **Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA:** Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9742-9747 (2001).
20. **Carthew RW, Sontheimer EJ:** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655 (2009).
21. **Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR:** Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26:2442-2450 (2003).
22. **Chapman AB, Knight DM, Ringold GM:** Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene. *J Cell Biol* 101:1227-1235 (1985).
23. **Creutzfeldt W, Ebert R, Willms B, Frerichs H, Brown JC:** Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: increased response to stimulation and defective feedback control of serum levels. *Diabetologia* 14:15-24 (1978).
24. **Dallas A, Vlassov AV:** RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit* 12:RA67-74 (2006).
25. **Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML:** Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 86:1234-1242 (2004).
26. **Day C:** Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4:32-38 (2007).
27. **Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ:** Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44:1126-1131 (1995).
28. **Denli AM, Hannon GJ:** RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28:196-201 (2003).
29. **Dharmacon:** Dharmacon RNAi Technologies, siRNA Design-Center. <http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx> (Tag des Zugriffs: 28.12.2009).
30. **Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, Kissler S, Rubinson DA, Van Parijs L:** Rnai as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. *Annu Rev Physiol* 67:147-173 (2005).
31. **Drucker DJ:** Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol* 17:161-171 (2003).
32. **Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA:** Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-467 (2003).
33. **Ebert R, Nauck M, Creutzfeldt W:** Effect of exogenous or endogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) on plasma triglyceride responses in rats. *Horm Metab Res* 23:517-521 (1991).
34. **Eckel RH, Fujimoto WY, Brunzell JD:** Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes. *Diabetes (Abstract)* 28:1141-1142 (1979).

35. **Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T:** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498 (2001a).
36. **Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T:** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200 (2001b).
37. **Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y:** Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24:1076-1082 (1964).
38. **Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW:** Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282 (2004).
39. **Farmer SR:** Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263-273 (2006).
40. **Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR:** Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 21:319-329 (2001).
41. **Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M:** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413-7417 (1987).
42. **Ferri GL, Adrian TE, Ghatei MA, O'Shaughnessy DJ, Probert L, Lee YC, Buchan AM, Polak JM, Bloom SR:** Tissue localization and relative distribution of regulatory peptides in separated layers from the human bowel. *Gastroenterology* 84:777-786 (1983).
43. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC:** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811 (1998).
44. **Flatt PR:** Dorothy Hodgkin Lecture 2008. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) revisited: a new therapeutic target for obesity-diabetes? *Diabet Med* 25:759-764 (2008).
45. **Flatt PR:** Effective surgical treatment of obesity may be mediated by ablation of the lipogenic gut hormone gastric inhibitory polypeptide (GIP): evidence and clinical opportunity for development of new obesity-diabetes drugs? *Diab Vasc Dis Res* 4:151-153 (2007).
46. **Freeman JS, Unger J:** Why and when to implement incretin therapy. *J Fam Pract* 57:S19-25 (2008).
47. **Fulurija A, Lutz TA, Sladko K, Osto M, Wielinga PY, Bachmann MF, Saudan P:** Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS ONE* 3:e3163 (2008).
48. **Gaillard D, Wabitsch M, Pipy B, Negrel R:** Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. *J Lipid Res* 32:569-579 (1991).
49. **Gault VA, Irwin N, Green BD, McCluskey JT, Greer B, Bailey CJ, Harriott P, O'Harte F P, Flatt PR:** Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3)GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes. *Diabetes* 54:2436-2446 (2005).
50. **Gault VA, McClean PL, Cassidy RS, Irwin N, Flatt PR:** Chemical gastric inhibitory polypeptide receptor antagonism protects against obesity, insulin resistance, glucose intolerance and associated disturbances in mice fed high-fat and cafeteria diets. *Diabetologia* 50:1752-1762 (2007).
51. **Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)* 14:1124-1131 (2006).

52. **Goossens GH, Blaak EE, van Baak MA:** Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* 4:43-55 (2003).
53. **Gregoire FM, Smas CM, Sul HS:** Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809 (1998).
54. **Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K:** New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33:151-163 (2004).
55. **Grimm D:** Small silencing RNAs: state-of-the-art. *Adv Drug Deliv Rev* 61:672-703 (2009).
56. **Grimm D, Kay MA:** RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 473-481 (2007).
57. **Grundy SM:** Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:629-636 (2008).
58. **Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C:** Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109:433-438 (2004).
59. **Guo S, Kempnues KJ:** par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620 (1995).
60. **Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ:** Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2:110-119 (2001).
61. **Hannon GJ:** RNA interference. *Nature* 418:244-251 (2002).
62. **Hansen JB, Kristiansen K:** Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 398:153-168 (2006).
63. **Hansotia T, Maida A, Flock G, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Drucker DJ:** Extra-pancreatic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest* 117:143-152 (2007).
64. **Harp JB:** New insights into inhibitors of adipogenesis. *Curr Opin Lipidol* 15:303-307 (2004).
65. **Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Moore ML:** Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 9:Unit 9 4 (2008).
66. **Higashimoto Y, Opara EC, Liddle RA:** Dietary regulation of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) gene expression in rat small intestine. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110:207-214 (1995).
67. **Hoist JJ, Lasalle JR:** An overview of incretin hormones. *J Fam Pract* 57:S4-9 (2008).
68. **Hutvagner G, Zamore PD:** RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12:225-232 (2002).
69. **IDF:** The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. http://www.idf.org/webdata/docs/Metac_syndrome_def.pdf (Tag des Zugriffs: 18.08.2009). (2005).
70. **Irwin N, Flatt PR:** Evidence for beneficial effects of compromised gastric inhibitory polypeptide action in obesity-related diabetes and possible therapeutic implications. *Diabetologia* (2009).

71. **Irwin N, Gault VA, Green BD, Greer B, McCluskey JT, Harriott P, O'Harte FP, Flatt PR:** Effects of short-term chemical ablation of the GIP receptor on insulin secretion, islet morphology and glucose homeostasis in mice. *Biol Chem* 385:845-852 (2004).
72. **Irwin N, Hunter K, Flatt PR:** Comparison of the metabolic effects of GIP receptor antagonism and PYY(3-36) receptor activation in high fat fed mice. *Peptides* 28:2192-2198 (2007).
73. **Irwin N, McClean PL, Patterson S, Hunter K, Flatt PR:** Active immunisation against gastric inhibitory polypeptide (GIP) improves blood glucose control in an animal model of obesity-diabetes. *Biol Chem* (2008).
74. **Isomaa B:** A major health hazard: The metabolic syndrome. *Life Sciences* 73:2395-2411 (2003).
75. **Iwen KA, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M, Klein J:** Putting Fat Cells Onto the Road Map to Novel Therapeutical Strategies. *Discovery Medicine* 6:75-81 (2006).
76. **Jackson AL, Linsley PS:** Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20:521-524 (2004).
77. **Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP:** Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7569-7574 (2003).
78. **Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA:** Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31:957-973 (1996).
79. **Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D:** Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 172:6545-6549 (2004).
80. **Katome T, Obata T, Matsushima R, Masuyama N, Cantley LC, Gotoh Y, Kishi K, Shiota H, Ebina Y:** Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J Biol Chem* 278:28312-28323 (2003).
81. **Kendall DM, Cuddihy RM, Bergenstal RM:** Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use. *Am J Med* 122:S37-50 (2009).
82. **Kershaw EE, Flier JS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556 (2004).
83. **Kim SJ, Nian C, McIntosh CH:** Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 282:8557-8567 (2007).
84. **Kim VN:** MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 14:156-159 (2004).
85. **Kim VN, Han J, Siomi MC:** Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126-139 (2009).
86. **Klein J, Fasshauer M, Ito M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR:** beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem* 274:34795-34802 (1999).
87. **Klein J, Permana PA, Owecki M, Chaldakov GN, Bohm M, Hausman G, Lapiere CM, Atanassova P, Sowinski J, Fasshauer M, Hausman DB, Maquoi E, Tonchev AB, Peneva VN, Vlachanov KP, Fiore M, Aloe L, Slominski A, Reardon CL, Ryan TJ, Pond CM:** What are subcutaneous adipocytes really good for? *Exp Dermatol* 16:45-70 (2007).

88. **Klein J, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M:** Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab* 17:26-32 (2006).
89. **Knapper P, MORGAN F:** Investigations into the Actions of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and Glucagon-Like Peptide-1(7-36)amide on Lipoprotein Lipase Activity in Expiants of Rat Adipose Tissue. *J. Nutr.* 125: 183-188, 1995. (1995).
90. **Kopelman PG:** Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643 (2000).
91. **Kraus D, Fasshauer M, Klein J:** Neuropeptide and Peripheral Hormone Crosstalk with Adipocyte Function. *New Century Health Publishers* 1:(2005).
92. **Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR:** Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 2:1300-1304 (1987).
93. **Kylin E:** Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. *Zentralblatt für Innere Medizin* 44:105-127 (1923).
94. **LaBarre J:** Sur les possibilites d'un traitment du diabete par l'incetine. *Bull Acad R Med Belg* 12:620-634 (1932).
95. **Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN:** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419 (2003).
96. **Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN:** MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21:4663-4670 (2002).
97. **Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW:** Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117:69-81 (2004).
98. **Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology* 141:3710-3716 (2000).
99. **Lindstrom P:** The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *Scientific-WorldJournal* 7:666-685 (2007).
100. **Lovshin JA, Drucker DJ:** Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 5:262-269 (2009).
101. **Lui EY, Asa SL, Drucker DJ, Lee YC, Brubaker PL:** Glucagon and related peptides in fetal rat hypothalamus in vivo and in vitro. *Endocrinology* 126:110-117 (1990).
102. **Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA:** Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433 (2002).
103. **Mauser W, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Klein J:** Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function, and inhibition of glucose uptake. *Eur J Pharmacol* 564:37-46 (2007).
104. **McClellan PL, Gault VA, Irwin N, McCluskey JT, Flatt PR:** Daily administration of the GIP-R antagonist (Pro3)GIP in streptozotocin-induced diabetes suggests that insulin-dependent mechanisms are critical to anti-obesity-diabetes actions of (Pro3)GIP. *Diabetes Obes Metab* 10:336-342 (2008).
105. **McClellan PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR:** GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1746-1755 (2007).

106. **McIntosh CH, Bremsak I, Lynn FC, Gill R, Hinke SA, Gelling R, Nian C, McKnight G, Jaspers S, Pederson RA:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology* 140:398-404 (1999).
107. **McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). *Vitam Horm* 80:409-471 (2009).
108. **McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS:** New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. *Lancet* 2:20-21 (1964).
109. **McManus MT, Sharp PA:** Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3:737-747 (2002).
110. **Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS:** Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364:137-144 (2002).
111. **Meier JJ, Gallwitz B, Kask B, Deacon CF, Holst JJ, Schmidt WE, Nauck MA:** Stimulation of insulin secretion by intravenous bolus injection and continuous infusion of gastric inhibitory polypeptide in patients with type 2 diabetes and healthy control subjects. *Diabetes* 53 Suppl 3:S220-224 (2004).
112. **Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz b:** Gastric Inhibitor Polypeptide - the neglected incretin revisited. *ScienceDirect* (2002).
113. **Meister G, Tuschl T:** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349 (2004).
114. **Mitra P, Zheng X, Czech MP:** RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J Biol Chem* 279:37431-37435 (2004).
115. **Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashika A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomoro T, Seino Y:** Inhibition of gastric inhibitor polypeptide signaling prevents obesity. *Nature Medicine* 8:738-742 (2002).
116. **Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y:** Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14843-14847 (1999).
117. **Mojsov S, Weir GC, Habener JF:** Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79:616-619 (1987).
118. **Moore B:** On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J* 1:28-38 (1906).
119. **Morgan LM:** The metabolic role of GIP: physiology and pathology. *Biochem Soc Trans* 24:585-591 (1996).
120. **Morgan LM, Flatt PR, Marks V:** Nutrient regulation of the enteroinsular axis and insulin secretion. *Nutr Res Rev* 1:79-97 (1988).
121. **Mudaliar S, Henry RR:** Incretin therapies: effects beyond glycemic control. *Am J Med* 122:S25-36 (2009).
122. **Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R:** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289 (1990).

123. **Naslund E, Bogefors J, Skogar S, Gryback P, Jacobsson H, Holst JJ, Hellstrom PM:** GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *Am J Physiol* 277:R910-916 (1999).
124. **Nauck MA:** Unraveling the science of incretin biology. *Am J Med* 122:S3-S10 (2009).
125. **Nauck MA, Baller B, Meier JJ:** Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3:S190-196 (2004).
126. **Nguyen QD, Shah SM, Browning DJ, Hudson H, Sonkin P, Hariprasad SM, Kaiser P, Slakter JS, Haller J, Do DV, Mieler WF, Chu K, Yang K, Ingerman A, Vittori RL, Berliner AJ, Cedarbaum JM, Campochiaro PA:** A Phase I Study of Intravitreal Vascular Endothelial Growth Factor Trap-Eye in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* (2009).
127. **Oben J, Morgan L, Fletcher J, Marks V:** Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *J Endocrinol* 130:267-272 (1991).
128. **Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS:** Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16:948-958 (2002a).
129. **Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ:** Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1443-1448 (2002b).
130. **Parker JC, Lavery KS, Irwin N, Green BD, Greer B, Harriott P, O'Harte FP, Gault VA, Flatt PR:** Effects of sub-chronic exposure to naturally occurring N-terminally truncated metabolites of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), GIP(3-42) and GLP-1(9-36)amide, on insulin secretion and glucose homeostasis in ob/ob mice. *J Endocrinol* 191:93-100 (2006).
131. **Pawitan JA:** The possible use of RNA interference in diagnosis and treatment of various diseases. *Int J Clin Pract* 63:1378-1385 (2009).
132. **Pebernard S, Iggo RD:** Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* 72:103-111 (2004).
133. **Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM:** Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 141:4600-4605 (2000).
134. **Perwitz N:** Neuropeptidgerge Regulation der Fettgewebefunktion – molekulare Mechanismen direkt peripherer Wirkansätze zur Kontrolle der Energiehomöostase. *Diss. rer. nat., Lübeck* (2008).
135. **Perwitz N, Fasshauer M, Klein J:** Cannabinoid receptor signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm Metab Res* 38:356-358 (2006).
136. **Perwitz N, Fasshauer M, Klein J:** Die neue Sicht des Fettgewebes: Master Mind hinter Pathogenese und Therapie des Metabolischen Syndroms. *Focus MUL* 21:(2004).
137. **Puri V, Chakladar A, Virbasius JV, Konda S, Powelka AM, Chouinard M, Hagan GN, Perugini R, Czech MP:** RNAi-based gene silencing in primary mouse and human adipose tissues. *J Lipid Res* 48:465-471 (2007).
138. **Qiao Q, Gao W, Zhang L, Nyamdorj R, Tuomilehto J:** Metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem* 44:232-263 (2007).
139. **Rajala MW, Scherer PE:** The Adipocyte - At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773 (2003).

140. **Ranganath LR:** The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med* 46:43-56 (2008a).
141. **Ranganath LR:** Incretins: pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *J Clin Pathol* 61:401-409 (2008b).
142. **Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J:** siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61:746-759 (2009).
143. **Reaven GM:** Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607 (1988).
144. **Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM:** Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8:532-539 (2008).
145. **Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A:** Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330 (2004).
146. **Richter G, Goke R, Goke B, Schmidt H, Arnold R:** Characterization of glucagon-like peptide-I(7-36)amide receptors of rat lung membranes by covalent cross-linking. *FEBS Lett* 280:247-250 (1991).
147. **Rosen ED, Spiegelman BM:** Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847-853 (2006).
148. **Ruiz-Grande C, Alarcon C, Merida E, Valverde I:** Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13:13-16 (1992).
149. **Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS:** Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1892-1897 (2004).
150. **Schutze N:** siRNA technology. *Mol Cell Endocrinol* 213:115-119 (2004).
151. **Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD:** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208 (2003).
152. **Shimba S:** Application of RNA interference techniques to adipose cell cultures. *Methods Mol Biol* 456:249-257 (2008).
153. **Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR:** Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839 (2003).
154. **Sledz CA, Williams BR:** RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 32:952-956 (2004).
155. **Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS:** Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 274:12632-12641 (1999).
156. **Smas CM, Sul HS:** Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 309 (Pt 3):697-710 (1995).
157. **Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP:** Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 12:694-699 (2006).
158. **Song DH, Getty-Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glucose uptake in part through Akt activation. *Gastroenterology* 133:1796-1805 (2007).

159. **Song DH, Wolfe MM:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its role in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:46-51 (2007).
160. **Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC:** A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5515-5520 (2002).
161. **Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH:** The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36:489-519 (2002).
162. **Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM:** mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224-1234 (1994).
163. **Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y, Seino Y:** Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol* 20:1644-1651 (2006).
164. **Unger RH, Eisentraut AM:** Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 123:261-266 (1969).
165. **Usdin T, Mezey E, Button D, Brownstein M, Bonner T:** Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin- vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133:2861-2870 (1993).
166. **Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF:** Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem* 278:7108-7118 (2003).
167. **von Eije KJ, Berkhout B:** RNA-interference-based gene therapy approaches to HIV type-1 treatment: tackling the hurdles from bench to bedside. *Antivir Chem Chemother* 19:221-233 (2009).
168. **Westphal S, Perwitz N, Iwen KA, Kraus D, Schick R, Fasshauer M, Klein J:** Expression of ATRAP in adipocytes and negative regulation by beta-adrenergic stimulation of JAK/STAT. *Horm Metab Res* 40:165-171 (2008).
169. **Wideman RD, Kieffer TJ:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide as a regulator of beta cell function and fate. *Horm Metab Res* 36:782-786 (2004).
170. **Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR:** PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* 101:22-32 (1998).
171. **Xie D, Cheng H, Hamrick M, Zhong Q, Ding KH, Correa D, Williams S, Mulloy A, Bollag W, Bollag RJ, Runner RR, McPherson JC, Insogna K, Isaacs CM:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover. *Bone* 37:759-769 (2005).
172. **Yamada Y, Seino Y:** Physiology of GIP--a lesson from GIP receptor knockout mice. *Horm Metab Res* 36:771-774 (2004).
173. **Yeung CM, Wong CK, Chung SK, Chung SS, Chow BK:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide gene expression in the stomach: revealed by a transgenic mouse study, in situ hybridization and immunohistochemical staining. *Mol Cell Endocrinol* 154:161-170 (1999).
174. **Yip RG, Boylan MO, Kieffer TJ, Wolfe MM:** Functional GIP receptors are present on adipocytes. *Endocrinology* 139:4004-4007 (1998).
175. **Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ:** Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359:824-830 (2002).

176. **Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C:** Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 25:790-797 (2007).
177. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994).
178. **Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, Toyoda K, Naitoh R, Mizunoya W, Fushiki T, Kadowaki T, Seino Y:** Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 335:937-942 (2005).
179. **Zhou QL, Park JG, Jiang ZY, Holik JJ, Mitra P, Semiz S, Guilherme A, Powelka AM, Tang X, Virbasius J, Czech MP:** Analysis of insulin signalling by RNAi-based gene silencing. *Biochem Soc Trans* 32:817-821 (2004).

IX. DANKSAGUNGEN

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Johannes Klein an dieser Stelle meinen Dank aussprechen, mir diese Arbeit ermöglicht zu haben. Auf der Suche nach einem geeigneten Dissertationsthema gefiel mir die thematische Ausrichtung der Arbeitsgruppe gleich. Ich bin sehr froh, dass ich mich mit dem Fettgewebe als Querschnittsorgan zwischen wesentlichen Funktionen des gesunden Körpers wie Immunfunktion, endokrinen Funktionen, Fortpflanzung und Energiehomöostase beschäftigen durfte.

Weiterhin gebührt Frau Dr. rer. nat. Nina Perwitz ein großes Dankeschön. Sie hat mich wie niemand sonst von den ersten Handgriffen an der Bench über ca. 1000 inhaltliche, handwerkliche und methodische Fragestellungen bis hin zur Korrektur dieser Arbeit während meiner gesamten Promotionszeit gefördert, gefordert und unterstützt. Ebenso haben Britta Meier und Maren Drenckhan mir stets geduldig alle Frage beantwortet und mich unheimlich bei der Datenerhebung unterstützt. Vielen Dank, dass Eure Labortür immer offen stand.

Ohne Dr. rer. nat. Dirk Hadaschik wären meine Daten, die mit der shRNA entstanden, niemals entstanden. Vielen Dank für Deine Zellen, Dein *Know-how*, Deine Protokolle und Deine aktive Unterstützung bei der Erstellung der Knockdown-Zelllinien. Schade, dass Du nicht länger in Lübeck geblieben bist.

Meinen beiden Mitdotorandinnen Isabel Wagner und Julia Hoppmann möchte ich danken, da mir im Labor niemals langweilig geworden ist und ich stets Spaß an der Arbeit hatte; auch wenn die PCR mal wieder schief ging.

Mit Dr. med. Alexander Iwen hatte ich einen weiteren Betreuer, der mich unterstützt hat und mir inhaltlichen Input geliefert hat.

Den Mitarbeitern der AG Prof. Dr. med. Olaf Hiort danke ich für geliehenes Material und Unterstützung bei den Sequenzierungsversuchen.

Frau Rita Wegner aus dem Schreibbüro danke ich für die Korrektur meiner Arbeit. Ich traue mich nicht zu sagen, wie viele Rechtschreibfehler sonst in dieser Doktorarbeit wären.

Zu guter Letzt möchte ich ganz besonders herzlich meinen Eltern Joachim und Johanna Schröder danken, die nicht nur diese Arbeit, sondern meine gesamte Ausbildung erst möglich gemacht haben. Ich kann nicht ausdrücken, wie unendlich dankbar ich Euch dafür bin; diese Arbeit ist für Euch!

X. LEBENS LAUF

Beruf, Studium, Wehrdienst und Schulausbildung

seit 09/09	Assistenzarzt für Innere Medizin, UKSH, Campus Lübeck, Med. Klinik I
07/09	Approbation als Arzt
06/09	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/08 bis 01/09	Praktisches Jahr
10/04 bis 10/07	Universität zu Lübeck, klinischer Studienabschnitt
02/06 bis 07/06	Auslandssemester (Erasmus) an der Universidad de Murcia, Spanien
09/04	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/02 bis 09/04	Universität zu Lübeck, vorklinischer Studienabschnitt
01/02 bis 08/02	Dienst im Geschäftszimmer der Elektronikstaffel des Marinefliegergeschwaders MFG 2, Tarp
05/02	Versorgungsstaffel der Auslandsverlegung nach Goose Bay, Kanada
10/01 bis 12/01	Grundwehrdienst im Stabsdienst, Marineversorgungsschule MVS 2, List/Sylt
08/92 bis 07/01	Gymnasium Wentorf, Abschluss allgemeine Hochschulreife
08/88 bis 07/92	Grundschule Wentorf

Tertiale im Praktischen Jahr

10/08 bis 01/09	Praxis für Allgemeinmedizin und hausärztliche Versorgung, Dres. Niebuhr und Ruser, Lübeck
08/08 bis 10/08	Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhauses Hamburg
06/08 bis 08/08	Department of Surgery, Concord Repatriation General Hospital, University of Sydney, Australien
02/08 bis 06/08	Medizinische Klinik I, UKSH Campus Lübeck

Famulaturen

10/07	Diabetes-Schwerpunktpraxis und hausärztliche Versorgung, Dr. Stengel
9/07	Innere Medizin, UKSH Campus Lübeck (Prof. Klein)
08/06	Innere Medizin, Allgemeines Bethesda Krankenhaus Hamburg (Prof. v. Schrenck)
10/05	nephrologische Gemeinschaftspraxis mit Dialyse (Dres. Glöer, Staben, Färber, Feyerabend)
02/05 bis 03/05	Chirurgie, St.-Joseph-Krankenhaus Freiburg (Prof. Salm, Prof. Schlickewei)

XI. PUBLIKATIONSLISTE

Im Zeitraum dieser Arbeit ist folgende Publikation und Vortrag entstanden:

1. Poster Doktorrandentag 2007
 - „*Fette Forschung – im Fokus das Fett*“
(Anna-C. Bohl, Julia Hoppmann, Torsten Schröder, Isabel Wagner)
 - Internetquelle:
<http://www.medizin.uni-luebeck.de/pdf/studierende/UniImDialog2007/FetteForschungHoppmann.pdf>
(Tag des Zugriffs 18.11.2010)
2. Vortrag Kongress Young Active Research 11th Annual Meeting 2009, München
 - *Knockdown of the gastric inhibitor polypeptide (GIP) receptor (GIPR) on adipocytes using RNA Interference and its influence on adipogenesis.*

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt zu haben.

Lübeck, den 18.11.2010

Torsten Schröder