

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie des Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das Chemerin-Rezeptor-System in seinem Einfluss auf die
Glukosehomöostase von Nagerzellen und sein Vorkommen in
humanen Tumorzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annika Müller

aus Hattingen

Datum der Promotion: 06.03.2020

Für meine Familie.

*„Der Glaube, es gebe nur eine Wirklichkeit, ist die gefährlichste
Selbsttäuschung.“*

Paul Watzlawik

Inhaltsverzeichnis

1	Tabellenverzeichnis.....	1
2	Abbildungsverzeichnis.....	2
3	Abstract.....	4
4	Einleitung.....	6
4.1	Glukosehomöostase	6
4.2	Metabolisches Syndrom und Insulinresistenz	10
4.3	Chemerin und seine Rolle als Adipokin	13
4.4	Chemerin und Chemokin-like Rezeptor 1 (CMKLR1)	14
4.5	Chemerin und Tumore	17
4.6	Die Chemerin-Rezeptoren CCRL2 Und GPR1	18
4.7	Ziele dieser Arbeit.....	19
5	Material und Methoden.....	20
5.1	Chemikalien	20
5.1.1	Substanzen für die Zellkultur	20
5.1.2	Puffer und Lösungen	20
5.1.3	Peptide	21
5.1.4	Kits	21
5.2	Enzyme.....	21
5.3	Antikörper und Oligonukleotide.....	21
5.3.1	Primäre Antikörper.....	21
5.3.2	Sekundäre Antikörper.....	22
5.3.3	Primer und Probes für die qPCR	23
5.4	Zellkultur	23
5.4.1	Zellen und Kultivierung.....	23
5.4.2	Stabile Transfektion.....	25

5.5	Analyse von Zellkulturüberständen	25
5.5.1	EC50 Forskolin	25
5.5.2	SekretionsAssays mit pankreatischen α -Zellen (Nagerzelllinien)	26
5.6	Molekularbiologie	26
5.6.1	Präparation von mRNA.....	26
5.6.2	Präparation von cDNA.....	26
5.6.3	Quantitative real-Time Polymerasekettenreaktion – qPCR	27
5.7	Immunfluoreszenz.....	28
5.8	Proteinbiochemie	29
5.8.1	Western Blotting	29
5.8.2	ELISA	30
5.9	Datenanalyse.....	31
6	Ergebnisse	33
6.1	INR-Zellen.....	33
6.1.1	Vorversuch - Bestimmung der EC50 für Forskolin	33
6.1.2	Einfluss unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Glukagonsekretion	34
6.1.3	Glukagonsekretion unter Behandlung mit Forskolin	35
6.1.4	Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin	36
6.1.5	Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin und Forskolin.....	38
6.2	Alpha TC1 (α TC1) Zellen	39
6.2.1	Basale Glukagonsekretion.....	39
6.2.2	Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin und Forskolin.....	43
6.2.3	Charakterisierung der α TC1 c6 Zellen.....	47
6.3	Nachweis von Chemerin-Rezeptoren oder ihrer mRNA in unterschiedlichen Zelllinien durch Immunfluoreszenz, WB und qPCR.....	55
6.3.1	Antikörper-Validierung in transfizierten HEK-Zellen (mCMKLR1).....	55

6.3.2	Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz.....	56
6.4	Rezeptornachweis in humanen Zelllinien (hCMKLR1, hGPR1, hCCRL2)	59
6.4.1	Nachweis von Rezeptor-mRNA-Molekülen mittels qPCR.....	61
6.4.2	Validierung der qPCR Ergebnisse im WB	63
7	Diskussion	66
7.1	Die Rolle der Behandlung mit Chemerin in der Glukosehomöostase pankreatischer Nagerzellmodelle	66
7.1.1	Glukagonsekretion von INR- Zellen in vitro	66
7.1.2	Glukagonsekretion von Alpha TC1 Zellen in vitro.....	69
7.1.3	Der Einfluss einer Behandlung mit Chemerin auf die Glukagonsekretion von Alpha TC1 c6.....	72
7.2	Die Expression von Chemerin-Rezeptoren in gut verfügbaren Tumorzelllinien	74
7.2.1	Der Nachweis von mCMKLR1 in Nagerzelllinien mittels BZ194.....	74
7.2.2	Der Nachweis von Chemerin-Rezeptoren in humanen Tumorzelllinien....	75
8	Literaturverzeichnis	76
9	Anhang.....	82
9.1	Eidesstattliche Versicherung.....	82
9.2	Lebenslauf	83
9.3	Danksagung.....	86

1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Übersicht verwendeter Zelllinien	25
Tabelle 2 - Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz	57
Tabelle 3 - Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz – Wiederholung für relevante Zellen mit PFA-Fixierung	58

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Steuerung der Glukagonausschüttung auf zellulärer Ebene (α -Zelle): Über den SLC2A1-Transporter erfolgt die Internalisierung von Glucose.....	7
Abbildung 2 Prozesse an denen weißes Fettgewebe durch die Produktion von Adipokinen beteiligt ist.....	13
Abbildung 3 Immunfluoreszenz-Analyse von CMKLR1, Chemerin und Insulin in Maus-Inselzellen.....	16
Abbildung 4 Immunfluoreszenz-Analyse von CMKLR1, Somatostatin, Glukagon und Insulin in humanen Inselzellen.....	17
Abbildung 5: Kurvenfitting zur Ableitung der EC50 im Glukagon-Sekretions-Assay mit INR-Zellen	34
Abbildung 6: Glukagon-Sekretions-Assay mit INR-Zellen in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.....	35
Abbildung 7: Stimulation der Glukagonsekretion in INR-Zellen mit Hilfe von Forskolin	36
Abbildung 8: Behandlung der INR-Zellen mit Chemerin im Sekretions-Assay.....	37
Abbildung 9: INR-Zellen im Sekretions-Assay mit Vorinkubation unterschiedlicher Substanzen.....	38
Abbildung 10: Glukagonsekretion unbehandelter α TC1 Zellen in Zellkulturüberständen gruppiert nach Zeit.....	40
Abbildung 11: Glukagonsekretion unbehandelter α TC1 Zellen in Zellkulturüberständen gruppiert nach Klon.. ..	41
Abbildung 12: α TC1 p. - basale Glukagonsekretion in Abhängigkeit unterschiedlicher Glukosekonzentrationen.....	42
Abbildung 13 α TC1 p. - basale Glukagonsekretion in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Kulturmediums, gruppiert nach Glukosekonzentration. ...	42
Abbildung 14: Behandlung von α TC1 Klonen mit Chemerin-9 und Forskolin	44
Abbildung 15 Behandlung von α TC1 p. mit Chemerin im Sekretions-Assay.	45
Abbildung 16: Behandlung von α TC1 c6. mit Chemerin im Sekretions-Assay.. ..	47
Abbildung 17: Immunfluoreszenz an α TC1 c6 zum Nachweis von Glukagon.....	48
Abbildung 18: α TC1 c6 im Sekretions-Assay mit bekannten Inhibitoren und Stimulantien.....	49

Abbildung 19: α TC1 c6 - Test auf geeignete <i>well</i> -Größe der im Experiment verwendeten Zellkulturplatte.....	50
Abbildung 20: Behandlung von α TC1 c6. mit Chemerin im Sekretions-Assay.	51
Abbildung 21: Zeitliche Darstellung des Vorgehens bei der kombinierten Behandlung von α TC1 c6 mit Chemerin und GLP-1 (Versuch 1).	52
Abbildung 22: Behandlung von α TC1 c6 (Versuch 1) mit Chemerin und GLP-1.	53
Abbildung 23: Behandlung von α TC1 c6 (Versuch 2) mit Chemerin und GLP-1.	54
Abbildung 24: Mittelwerte mit Standardmessfehler der Versuche 1 und 2	55
Abbildung 25 Nachweis von mCMKLR1 in transfizierten Zellen.	56
Abbildung 26 Überlagerung von Hellfeld- und Immunfluoreszenz-Mikroskopie von INR-Zellen.....	58
Abbildung 27 Vorkommen von Rezeptoren in Zelllinien nach Datenbanken von 03/2013.....	60
Abbildung 28 Nachweis von CMKLR1-mRNA in humanen Tumorzelllinien.....	61
Abbildung 29 Nachweis von CCRL2-mRNA in humanen Tumorzelllinien.	62
Abbildung 30 Nachweis von GPR1-mRNA in humanen Tumorzelllinien.	62
Abbildung 31 WB - CMKLR1-Nachweis in unterschiedlichen Ziellinien.	64
Abbildung 32 WB - CCRL2-Nachweis.....	64

3 Abstract

Chemerin und sein Rezeptor CMKLR1 wurden als Regelsystem metabolischer Funktionen beschrieben, darunter im Besonderen der in pankreatischen Inselzellen auf Grund des dort lokalisierten Rezeptors, sowie die Funktion von Chemerin als Adipokin. Potentiell könnten sich daraus neue Behandlungsstrategien der T2DM-assoziierten Insulinresistenz ergeben. Dazu sind jedoch weitere Studien der physiologischen Funktion von Chemerin erforderlich. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Chemerin über den auf α -Zellen lokalisierten CMKLR1 in bestimmten Stoffwechsellagen Einfluss auf die Glukagonsekretion dieser Zellen nehmen kann. Die an α -Zellen vorgenommenen *in vitro* Versuche zeigten eine die Glukagonsekretion hemmende Wirkung von Chemerin. Um weitere Behandlungsansätze des T2DM und im größeren Rahmen auch Entstehungs- und Behandlungsweisen des Metabolischen Syndroms zu entwickeln und zu verstehen, spielt das Verständnis der physiologischen und pathologischen Funktion von Chemerin und seiner drei Rezeptoren eine große Rolle. Hierzu wurden diverse humane und einige murine Zelllinien auf das Vorkommen von CMKLR1, GPLR1 und CCRL2 mit unterschiedlichen Methoden (Immunfluoreszenz, Western Blot, qPCR) getestet. Die Analysen zeigten, dass eine Reihe von humanen Tumorzelllinien sehr hohe Expressionswerte aufwiesen, die auf eine Überexpression des entsprechenden Rezeptors in der zugehörigen Tumorentität hindeuten könnten. CMKLR1 könnte angesichts der Befunde in DU4475- und MDA-MB-23- Zellen im Mammakarzinom überexprimiert sein. Die DU4475-Zelllinie wurde in dieser Arbeit als geeignetes Modellsystem für die Untersuchung des potenziellen Targets CMKLR1 im Mammakarzinom identifiziert.

Chemerin and its receptor CMKLR1 have been described as a regulatory system for metabolic functions, especially connected to the pancreatic islet cells due to local receptor localisation as well as the function of Chemerin as an adipokine. Potentially this knowledge can lead to new therapeutic strategies of T2DM-associated insulin resistance. For this purpose, further studies of the physiological function of Chemerin are necessary. This report shows that Chemerin can influence the glucose secretion of α -cells in certain metabolic states via CMKLR1 located on these cells. The performed in vitro experiments with α -cells show an inhibiting effect of Chemerin on the glucose secretion. To develop new therapeutic strategies for T2DM and, on a larger scale, also understand and contrive treatment options for metabolic syndrome the physiological and pathological functions of Chemerin and its three receptors plays a key role. For this purpose, various humane as well as several murine cell lines were tested for CMKLR1, GPLR1 and CCRL2 expression with varying methods (immunofluorescence, Western Blot, qPCR). Analysis showed that a series of humane tumour cell lines show very high expression rates which may point to an overexpression of the according receptors in the corresponding tumour entity. Regarding the results in DU4475- and MDA-MB-23-cells CMKLR1 may be overexpressed in mammary carcinoma. In this study, the DU4475-cell line was identified as an appropriate model system for testing the potential target CMKLR1 in mammary carcinoma.

4 Einleitung

4.1 Glukosehomöostase

Im Rahmen des regelhaften menschlichen Stoffwechsels bezeichnet man die selbstständige Anpassung des Blutzuckerspiegels an die wechselnden Bedingungen zwischen Nahrungsaufnahme und Energiebereitstellung als Glukosehomöostase.

Der Glukosestoffwechsel im menschlichen Körper beginnt mit der Nahrungsaufnahme. Die meisten Kohlenhydrate nimmt der Mensch in Form von Stärke (Polysaccharid mit einer Molekülmasse von 100 – 1.000 kD) zu sich. Kohlenhydratpolymere müssen vor der Absorption durch die Enterozyten gespalten werden. Im Rahmen dieser hydrolytischen Spaltung entstehen mit Hilfe der α -Amylase, enthalten in Speichel und Pankreassekret, zuerst Oligosaccharide. Diese werden im Zuge der membranassoziierten Verdauung zusammen mit Disacchariden (Saccharose, Laktose) weiter in Monosaccharide gespalten. Monosaccharide (Galaktose, Glukose [Glc], Fruktose) können dann von den Darmzellen des oberen Dünndarms mittels verschiedener Transporter aufgenommen werden. Über den Blutkreislauf spielt sich danach die Verteilung hin zu einzelnen Organsystem ab, wobei die Plasmaglukosekonzentration in einem physiologischen Bereich zwischen 4 und 7 mM liegt. Das Pankreas spielt bei der Regulation dieses Glukosespiegels eine Hauptrolle. Zur Regulation der Blutglukosekonzentration findet ein stetes Wechselspiel zwischen dessen Hormonen Insulin und Glukagon (GCG) statt.

Die Langerhans'schen Inseln des Pankreas bestehen aus α -, β -, δ -, ϵ -, und PP-Zellen. Sie produzieren die Hormone Glukagon (α -Zellen), Insulin (β -Zellen), Somatostatin (δ -Zellen), Ghrelin (ϵ -Zellen) und pankreatisches Polypeptid (PP-Zellen). In Reaktion auf postprandial erhöhte Glukosekonzentrationen im Blut sezernieren die β -Zellen des Pankreas Insulin, welches die zelluläre Aufnahme der im Blut befindlichen Nährstoffe (Glukose, freie Fettsäuren, Glyzerin) insbesondere zur Energiespeicherung in Muskel, Leber und Fettgewebe fördert und gleichzeitig die Glukoseproduktion in der Leber minimiert (Hemmung der Glukoneogenese). Gastrointestinale Hormone, insbesondere *glucagon-like-peptide* (GLP) und *gastric inhibitory peptide* (GIP) verstärken den Einfluss von Glukose auf die Insulin-Ausschüttung. Sie werden noch vor der enteralen Absorption der Kohlenhydrate ausgeschüttet und sensibilisieren die pankreatischen β -Zellen für den Einfluss von Glukose. Ein wichtiger Gegenspieler des Insulins ist

Glukagon. Sinkt die Blutglukosekonzentration, wird Glukagon ausgeschüttet. Die Hypoglykämie im Organismus ist der potenteste Stimulus für die Glukagonsekretion.⁴ Die α -Zellen des Pankreas nehmen Glukose über den SLC2A1-Transporter auf. Niedrige Konzentrationen von Glukose sorgen für eine moderate Aktivität von Kaliumkanälen in der Zellmembran, was zu einem Membranpotential der α -Zelle führt, bei dem sich spannungsabhängige T- und N-Typ Ca^{2+} -Kanäle sowie Na^+ -Kanäle öffnen. Dies triggert ein Aktionspotential, lässt Ca^{2+} in die Zelle einströmen und führt zur Exozytose von in Granula gespeichertem Glukagon.²

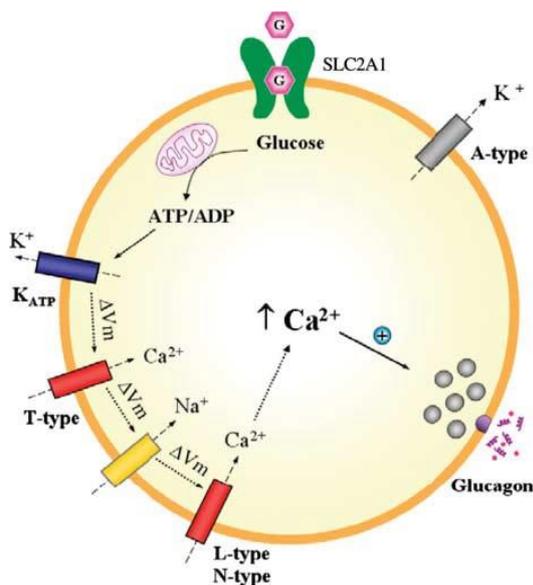


Abbildung 1 Steuerung der Glukagonausschüttung auf zellulärer Ebene (α -Zelle): Über den SLC2A1-Transporter erfolgt die Internalisierung von Glucose. Niedrige intrazelluläre Glukoselevel aktivieren K^+ -Kanäle in der Zellmembran, dass so gesteigerte Membranpotential triggert schließlich die Aktivität von spannungsabhängigen T- und N-Typ Ca^{2+} und Na^+ Kanälen, das Aktionspotential lässt nun Ca^{2+} in die Zelle einströmen und setzt in Granula gespeichertes Glucagon über Exozytose frei. Die Repolarisierung des Aktionspotentials erfolgt über A-Typ K^+ -Kanäle.

Hohe intrazelluläre Konzentrationen von Glukose hingegen erhöhen das ATP/ADP-Verhältnis innerhalb der Zelle, was K^+ -ATP-Kanäle blockiert und das Membranpotential in einen Bereich sinken lässt, in dem die spannungsabhängigen Kanäle inaktiviert werden. Die so gehemmte elektrische Aktivität stoppt das Einströmen von Ca^{2+} und die Exozytose von Glukagon.²

Glukagon ist ein Oligopeptid aus 29 Aminosäuren, sekretiert von pankreatischen α -

Zellen, welches die Glykogenolyse und die Glukoneogenese in der Leber aktiviert und so die gespeicherten Energiereserven freisetzt. Darüber hinaus wird die Lipolyse in Adipozyten stimuliert. Glukagon bindet an den Glukagonrezeptor (GCGR), der ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, und nach Bindung eine Signaltransduktionkaskade initiiert. Neben Leber und Adipozyten wurde der GCGR auch in Hirn, Gastrointestinaltrakt und Herz nachgewiesen. Allerdings ist die extrahepatische Bedeutung von Glukagon wenig erforscht.⁴ Zur Aktivierung des Hormons im Pankreas wird Proglukagon durch das Enzym Prohormon-Konvertase 2 zu Glukagon gespalten und dann freigesetzt.

Die Sekretion von Glukagon hängt, ebenso wie die Insulinsekretion von der Plasmaglukosekonzentration ab. Durch die somit entstehende Glukosehomöostase wird

für eine ständige Energieäquivalenz der gesorgt, sodass die Organe des menschlichen Organismus, im Besonderen das Gehirn, eine ausreichende Energiedeckung erfahren.

Fastet der menschliche Organismus, initiiert die Kombination aus niedrigen Insulinplasmakonzentrationen und erhöhten Plasmaspiegeln der gegenregulatorischen Hormone die Glukoneogenese und Glykogenolyse.⁵ Während ein Anstieg der Insulinsekretion bereits bei physiologischen Glukosekonzentrationen zwischen 4,4 und 4,7 mmol/l (80-85mg/dl) im Plasma beobachtet wird, liegt der Schwellenwert der Plasmaglukosekonzentration, der die Sekretion von Glukagon stimuliert mit 3,3 bis 4,7 mmol/l (60-65 mg/dl) unterhalb des physiologischen Bereichs. Es wird daher vermutet, dass in physiologischen Bereichen der Plasmaglukosekonzentration Insulin alleine die Glukosehomöostase reguliert und die Funktion von Glukagon erst unterhalb physiologischer Glukosekonzentrationen relevant wird. Die Wirkung von Insulin umfasst mehrere Gewebe (Fettgewebe, Muskel, Leber), während die biologisch am meisten relevante Konzentration von Glukagon im Pfortader-Blut zu finden ist, was die Leberzellen als primären Angriffs- und Zielpunkt der Wirkung von Glukagon nahelegt. Beiden Hormonen ist jedoch gemein, dass sie sehr potent sind und sehr geringe Schwankungen ihrer Konzentrationen bereits biologische Effekte hervorrufen. Dass beide Hormone an der Aufrechterhaltung eines euglykämien Zustands des menschlichen Organismus beteiligt sind, scheint klar. Die Frage, ob eines der beiden Hormone in der Hierarchie über dem anderen anzusehen ist und wie dies zu erklären ist, bedurfte zusätzlicher Beweise.⁶ Weitere Erkenntnisse ergaben sich aus „knockdown“-Experimenten in Mausmodellen, die zeigen, dass ein Abfall der Glukagonsekretion unter Hyperglykämie ausbleibt, sobald der Insulin-Signalweg (Perfusion des Pankreas mit Insulinantikörpern, siRNA-Unterdrückung von Insulin, Insulinrezeptor-Unterdrückung) gestört wird.⁴

In der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) spielen die α - und β -Zellen eine wichtige Rolle, da sich Funktionsstörungen dieser Zellen direkt auf die humane Glukosehomöostase auswirken. Störungen in beiden Regelsystemen, die sich als klinisches Bild des Diabetes mellitus (DM) manifestieren, sind eng miteinander verbunden.⁷ Eine Form des T2DM ist die Insulinresistenz, bei der insulinabhängige Glukoseaufnahme in Fettgewebe und Muskel vermindert ist. Daraus resultiert letztlich eine verstärkte Insulinproduktion der β -Zellen und eine Hyperinsulinämie.⁸ Bereits 1987

konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der Insulinresistenz nicht um eine Störung der Bindung von Insulin an seinen Rezeptor handelt, sondern eine Störung des Signalwegs innerhalb des Rezeptors verantwortlich ist. So ist in adipösen Patienten oft die Expression des Insulinrezeptors, sowie die Kinase-Aktivität des Rezeptors vermindert.⁹ Neben der Glukoseresorption ist auch die Glykogensynthese der Leber betroffen, die laut Shulman et al. im Falle einer Insulinresistenz gestört zu sein scheint.^{10,11} Die stete Hyperinsulinämie einer Insulinresistenz führt schließlich zur Insulinsekretionsstörung der β -Zellen und damit zur Manifestierung einer chronischen Hyperglykämie im Rahmen des T2DM.¹² Neuere Studien sehen eine metabolische Fehlordnung durch steten Kalorienüberfluss im Organismus, was zu einer Verfettung von Leber und Pankreas führt, als ursächlich für die Insulinresistenz.¹³

Da Glukagon in Patienten mit DM trotz Hyperglykämie erhöht ist, werden Theorien für neue Therapieansätze des DM durch Beeinflussung der Glukagonspiegel diskutiert. Schon früh konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass das Antagonisieren von Glukagon, sei es durch potente Antagonisten oder Antikörper und Immunneutralisation, den Blutglukosespiegel ohne therapeutische Zugabe von Insulin senken kann.¹⁴⁻¹⁶ Eine Form von Antagonisten (nach Jiang et al. „Compound1“) blockiert die Bindung von Glukagon an den humanen Hepatozyten und antagonisiert so die dort durch Glukagon vermittelten biologischen Effekte.¹⁷ Darüber hinaus zeigen präklinische Daten am Tiermodell, dass Mäuse mit defekter genetischer Anlage des Glukagonrezeptors (GCGR -/-) nach Destruktion der β -Zellen mittels Streptozotocin und einer damit erreichten, komplett unterbrochenen Insulinausschüttung, keinem Glukoseanstieg unterliegen. In diesen Mäusen konnte kein T2DM erzeugt werden, da die Hyperglykämie und weitere katabole Funktionsstörungen ausblieben.^{4,18} Weitere Experimente an Nagern festigen diese Beobachtungen und so befinden sich schon seit längerer Zeit oral verfügbare Glukagonrezeptor-Antagonisten (wie z.B. BAY 27-9955, Phase-II-Studie beendet) in der klinischen Entwicklung.^{4,19,20} Zusätzlich ist bekannt, dass die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors die Glukagonsekretion inhibiert. Eine weitere Substanzklasse (GLP-1-Rezeptor Agonisten, DPP-4-Inhibitoren), die Inkretin-basiert wirkt, versucht daher, den Signalweg des GLP-1 Rezeptors zu verstärken.^{21,22} Bisher bleibt die pharmakologisch hergestellte, normale Funktion der β -Zellen mit Aufhebung der Insulinresistenz und damit korrigierter Glukosehomöostase noch eine vielversprechende Vision in der Entwicklung.²³

4.2 Metabolisches Syndrom und Insulinresistenz

Als Ursachen des DM sind entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung (Insulinresistenz) beschrieben, bzw. eine Kombination aus beidem.²⁴ Es werden gemäß der jeweiligen Ursache für die Stoffwechselstörung vier Kategorien (Typen) des Diabetes mellitus unterschieden. Dazu gehören der DM Typ 1, Typ 2, andere Typen (A-H) und der Gestationsdiabetes. Hier soll auf den T2DM näher eingegangen werden, da dieser auf einer Insulinresistenz im Rahmen eines Metabolischen Syndroms beruht.

Fettleibigkeit hat in der westlichen Welt epidemische Ausmaße angenommen. Laut Statistischem Bundesamt ist annähernd jeder zweite Bundesbürger übergewichtig. Tritt Fettleibigkeit zusammen mit Insulinresistenz, Bluthochdruck und veränderten Blutfettwerten auf, spricht man vom Metabolischen Syndrom, so die Deutsche Adipositas Gesellschaft und die Deutsche Diabetes Gesellschaft in ihrer S3 Leitlinie „Prävention und Therapie der Adipositas“ von 2014. Das Metabolische Syndrom ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines T2DM, sowie für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Prävalenz liegt je nach Region und Geschlecht in Deutschland zwischen 18,4 und 27 %.²⁵ In 74,4 % der Patienten mit einem T2DM in Deutschland liegt ein Metabolisches Syndrom vor.²⁶ Eine Adipositas, bedingt durch übermäßige Kalorienzufuhr in Kombination mit Bewegungsmangel trägt somit entscheidend zur Entstehung der Insulinresistenz bei. Da die Mechanismen ihrer Entstehung noch immer nicht vollständig aufgedeckt sind, stellt diese in der Behandlung zur Eindämmung der kardiovaskulären Risikofaktoren noch immer eine große Herausforderung für Arzt und Patient dar. Um Patienten mit Metabolischem Syndrom effektiver behandeln zu können, ist es von großer Bedeutung, die Glukosehomöostase und die Möglichkeiten sie zu beeinflussen, besser zu verstehen.

Die Insulinresistenz wird durch das Vorliegen einer Adipositas begünstigt. Im Rahmen der oben beschriebenen Glukosehomöostase liegt bei Individuen mit steter, übermäßiger Nahrungszufuhr eine ebenso stete Ausschüttung von Insulin vor. Die resistenten Insulin-Zielzellen reagieren nur vermindert auf den Reiz des Insulins, weshalb die Blutglukosespiegel nach der Nahrungsaufnahme, bei konstanter Insulinproduktion, weiterhin hoch bleiben. In Folge der Überproduktion von Insulin werden die pankreatischen β -Zellen geschädigt. Es folgt eine Insulin-Sekretionsstörung,

auch im Rahmen von Zelluntergang. Der T2DM ist also durch eine Insulinresistenz bei eher relativem (zu hohe Plasmaglukosespiegel bei im Verhältnis dazu zu geringer Insulinausschüttung) als absolutem Insulinmangel gekennzeichnet. Unter dem Einfluss sogenannter Manifestations- oder Risikofaktoren, die häufig als Metabolisches Syndrom vorliegen, kommt es zur Entwicklung des klinischen Krankheitsbildes des T2DM.²⁷

Neben einer eingeschränkten Insulinsekretion und Insulinwirkung sind andere Pathomechanismen an der Entstehung des Krankheitsbildes T2DM beteiligt. Dazu gehören die erhöhte Lipolyse bei Insulinresistenz der Adipozyten (Anstieg der freien Fettsäuren im Blut), eine gesenkte gastrointestinale Inkretinsekretion (GLP-1), eine verstärkte Rückresorption von Glukose in der Niere, eine Dysfunktion von Neurotransmittern und eine beeinträchtigte Glukagonsekretion der α -Zellen des Pankreas.

All diese beeinträchtigten Mechanismen könnten in die Therapie des T2DM mit einbezogen werden.²⁸ Gerade die Rolle der Adipozyten und der beeinträchtigten α -Zellen bieten die Forschungsgrundlage zur Entwicklung neuer Therapien der Insulinresistenz und ihrer Folgen im Rahmen des Metabolischen Syndroms.

In der Diabetologie wird zur Langzeit-Analyse des Blutzuckerverlaufs die Glykierung von Hämoglobin A gemessen. Dieser Wert wird als HbA1c bezeichnet und in Promille angegeben. Da die Lebensdauer von Erythrozyten etwa 120 Tage beträgt (mittleres Alter 8 Wochen) gibt der HbA1c Aufschluss über das Blutzuckerverhalten in eben dieser Zeitspanne. Ein weiterer Parameter zur Beurteilung von Stoffwechselprozessen des menschlichen Körpers sind Lipoproteine, die Blutfette binden und so als Transporter ebendieser im Blut fungieren. Hier werden Proteine unterschiedlicher Dichte unterschieden. Das Low Density Lipoprotein (LDL) bindet vornehmlich Cholesterin in der Leber und führt es über das Blut anderen Organen zu. Die Grundpfeiler der Therapie des T2DM als Folge des Metabolischen Syndroms sind die Einstellung eines HbA1c-Zielkorridors zur Primärprävention von Folgekomplikationen, die LDL-Cholesterin-Senkung, die Gewichtsabnahme bei Übergewicht und die Einstellung des Blutdrucks auf systolische Werte unter 140 mmHg und diastolische Werte um 80 mmHg. Zum Erreichen dieser Therapieziele wird mit den Patienten primär eine Umstellung des Lebensstils (Bewegung, Ernährung) vereinbart, was gegebenenfalls mit einer medikamentösen Therapie (Insulin, orale Antidiabetika, Statine, Antihypertonikum)

kombiniert wird.²⁷ Auf die Ziele hinsichtlich einer Gewichtsreduktion im Rahmen einer Adipositas und deren Folgen skizziert die aktuelle Leitlinie zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. Hier heißt es: „durch eine Gewichtsabnahme verbessern sich – bei adipösen Patienten deutlicher als bei übergewichtigen – kardiovaskuläre Risikofaktoren (z. B. T2DM)“.²⁹ Die Vorteile einer Kombination oraler Antidiabetika beschreiben Hanefeld *et al* und stellen heraus, dass Metformin in der Kombination mit einem Sulfonylharnstoff die Konzentrationen von LDL-Cholesterin im Plasma signifikant senkt.³⁰ Die Fortschritte in der Prävention des T2DM beschreibt die Gruppe von Schernthaner und führt an, dass orale Antidiabetika wie Metformin, aber auch Blutdrucksenker wie ACE-Hemmer neben der Lebensstiländerung in Hochrisikopatienten das Manifestationsrisiko eines T2DM senken.³¹

Orale Antidiabetika bieten bei der medikamentösen Beeinflussung der Insulinresistenz im Rahmen des Metabolischen Syndroms erste Ansatzpunkte. So stimulieren Sulfonylharnstoffe die vom Blutglukosespiegel unabhängige Insulinsekretion der β -Zellen und Biguanide wie Metformin senken die Glukosoeresorption im Darm, sowie die Glukoneogenese in der Leber. Die Glukosespiegel werden also insulinabhängig (Sulfonylharnstoffe) und insulinunabhängig (Biguanide) gesenkt. Insulinabhängige Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels bergen immer das Risiko von Hypoglykämien, weshalb die Behandlung der Insulinresistenz an sich oder der mit ihr verbundenen Folgen ohne Steigerung des Insulinspiegels Themen intensiver Forschung darstellen.

4.3 Chemerin und seine Rolle als Adipokin

Das Fettgewebe ist durch die Sekretion von Botenstoffen an vielen regulatorischen Prozessen im menschlichen Organismus beteiligt, so zum Beispiel am Fettstoffwechsel

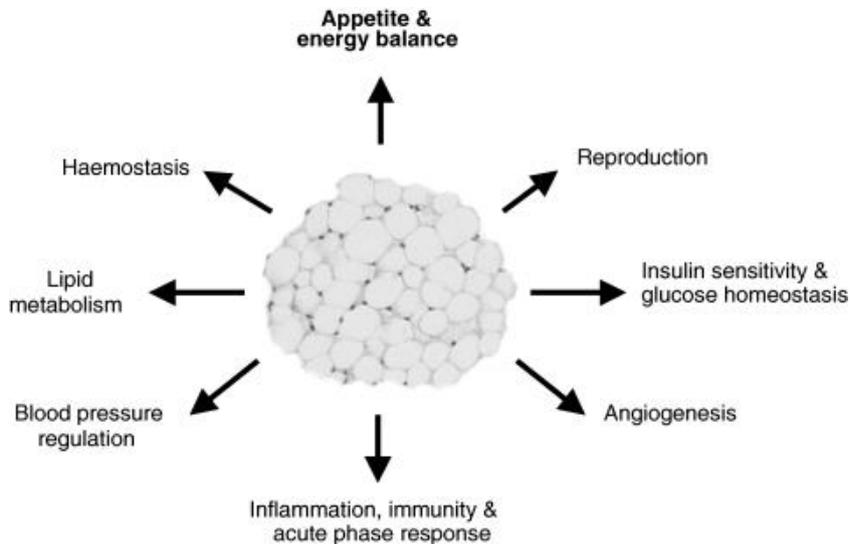


Abbildung 2 Prozesse an denen weißes Fettgewebe durch die Produktion von Adipokinen beteiligt ist.³ – Im Uhrzeigersinn: Appetit und Energiebalance, Reproduktion, Insulinsensitivität und Glukosehomöostase, Angiogenese, Entzündung, Immunität und akute-Phasereaktion, Blutdruckregulation, Fettstoffwechsel, Hämostase.

und an der Glukosehomöostase.^{3,5,32}

Ein vom Fettgewebe sezerniertes Hormon wird als Adipokin bezeichnet.³²

Abbildung 2 fasst zusammen, an welchen Vorgängen Adipokine beteiligt sind. Um

Erkrankungen wie das

Metabolische Syndrom

oder Diabetes besser

verstehen zu können, ist es

von großer Wichtigkeit, die

Biologie der Adipozyten besser zu verstehen.⁵ Chemerin ist ein Plasmaprotein, welches

von Adipozyten in weißem und braunem Fettgewebe sezerniert wird und deshalb der

Gruppe der Adipokine zugeordnet werden kann.³²⁻³⁴ Die aktuelle Forschung befasst

sich vor allem mit der Rolle von Chemerin im Zusammenhang mit kardiovaskulären

Erkrankungen, sowie dem Metabolischen Syndrom und Diabetes.³⁵ Als erstes erkannt

und beschrieben wurden jedoch die immunmodulatorischen Eigenschaften des Peptids.

2003 wurde Chemerin aus Psoriasis-Hautläsionen isoliert und analysiert. In anderen

Proben (z.B. Aszitesflüssigkeit), die hohe Anteile an Entzündungsmediatoren enthalten,

konnte das Peptid ebenfalls nachgewiesen werden.³⁶ Chemerin wurde als potentes

Chemoattraktant klassifiziert und es wurde gezeigt, dass es proinflammatorische

Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und C-reaktives Protein

(CRP) stimuliert.³⁶⁻³⁸ Die aktive Form des Chemerin entsteht durch Spaltung des

Vorläuferproteins Pro-Chemerin (163 Aminosäuren, niedrige biologische Aktivität),

wobei sich anhand der weiter prozessierten Isoform entscheidet, ob letztlich eine pro-

oder antiinflammatorische Wirkung ausgeübt wird.^{39,40} Beim Spalten des Pro-Chemerin

entstehen verschiedene Isoformen des Chemerins, die sich über dessen C-Terminus

charakterisieren. Die biologische Aktivität von Chemerin hängt unter anderem von der Spaltstelle und damit von den spaltenden Enzymen (Proteasen) sowie dem Organ der Isolation ab.³⁵ Neuere Erkenntnisse zeigen darüber hinaus eine Beteiligung des Proteins an Stoffwechselprozessen auf und beleuchten seine Rolle im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom. So besteht eine Korrelation zwischen Chemerinkonzentrationen im Serum und dem *body mass index* (BMI).^{34,41} Weiter konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serumkonzentrationen von Chemerin mit den Kriterien für das Metabolische Syndrom (u.a. Hypertriglyzeridämie, Bluthochdruck, Insulinresistenz) einhergehen^{33,42} und dass eine Lebensstilumstellung im Sinne körperlicher Betätigung die Serumkonzentration von Chemerin in adipösen Patienten senkt.⁴³ Sell et al. untersuchten die Einflüsse von Chemerin auf die Insulinresistenz und zeigen auf, dass mit Chemerin behandeltes Skelettmuskelgewebe eine gestörte Insulinwirkung und Glukoseaufnahme aufweist. Chemerin induziert folglich eine Insulinresistenz am Skelettmuskel.^{34,44,45} Der Einfluss von Chemerin auf die Glukosehomöostase in adipösen Mäusen konnte im Jahr 2010 nachgewiesen werden. Dort zeigte sich eine Verschlimmerung der Insulinresistenz bei exogener Gabe von Chemerin.⁴⁶ Darüber hinaus untersuchten Hansen et al. die Einflüsse auf die Chemerin-Genexpression. Im Tierexperiment mit RjHan:NMRI-Nacktmäusen wurde deutlich, dass eine Kälteexposition über längeren Zeitraum die Genexpression von Chemerin vermindert, während obesigene Diäten die Expression erhöhen.⁴⁷ Chemerin erscheint somit im Zusammenhang mit endokrinen, parakrinen und autokrinen Effekten.

4.4 Chemerin und Chemokin-like Rezeptor 1 (CMKLR1)

Im Jahr 2003 wurde Chemerin erstmals als Ligand des Chemokin-like Rezeptor 1 (CMKLR1), ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) der Klasse A, identifiziert. Ein GPCR ist ein Zelloberflächen-Rezeptor, mittels dessen äußere Reize in das Zellinnere übertragen werden. Im humanen Genom stellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren dar.^{48,49} Sie tangieren im menschlichen Organismus kardiovaskuläre, respiratorische, muskuläre und endokrine Funktionen⁵⁰⁻⁵³ und werden in sechs Unterfamilien bzw. drei Klassen gruppiert. Die genannte Klasse A, zu der CMKLR1 zugeordnet wird, stellt mit etwa 76 % aller GPCRs die größte Klasse dar und wird auch *rhodopsin-like family* genannt.^{54,55} So übt auch das Peptid Chemerin durch die Bindung an CMKLR1 eine Vielzahl von Funktionen im menschlichen Körper aus. CMKLR1-mRNA wurde 1996 in Geweben des

Immunsystems (Lymphdrüsen, Knochenmark, Thymus, Milz) nachgewiesen.⁵⁶ Neben der Expression von CMKLR1 in Zellen des Immunsystems (Makrophagen, dendritischen Zellen, CD65-positiven Killerzellen, polymorphkernigen Leukozyten, und Endothelzellen⁵⁷⁻⁵⁹ konnte eine Expression in Adipozyten^{33,47} gezeigt werden. In Fettgeweben adipöser Individuen ist die Expression von Chemerin und CMKLR1 deutlich hochreguliert.³⁴ Während Chemerin von reifen Adipozyten produziert wird, zeigen Segal et al., dass CMKLR1 in vaskulär-bindegewebsartigen Zellen und in Adipozyten zu finden ist, was eine Wirkung von Chemerin an beiden Geweben vermuten lässt.³³

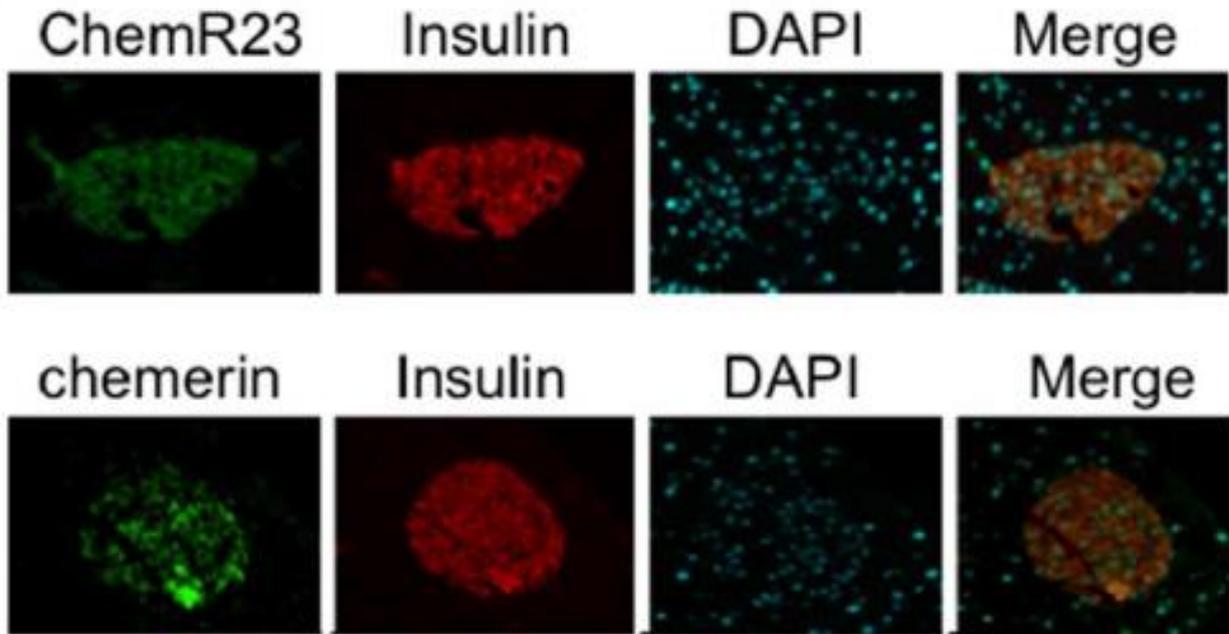


Abbildung 3 Immunfluoreszenz-Analyse von CMKLR1, Chemerin und Insulin in Maus-Inselzellen. Ursprung: Scientific Reports, Takahashi et al. Chemerin regulates beta-cell function in mice. Fig. 3 (2011;1:123), Nutzungserlaubnis via *creative commons*.

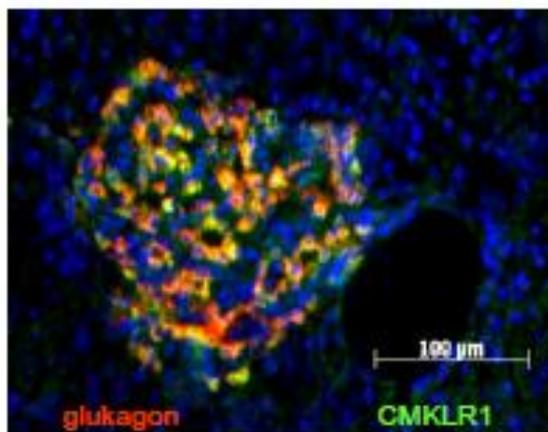
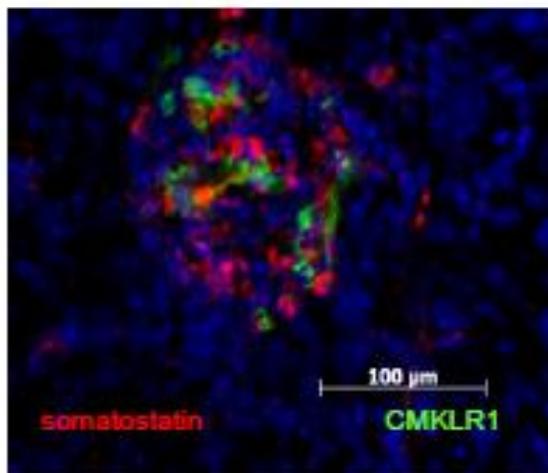
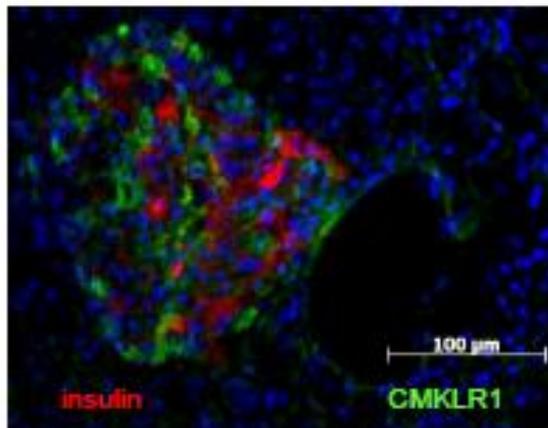
Grün: Färbung von oben CMKLR1 (hier ChemR23) und unten Chemerin mittels Antikörper von SantaCruz.

Rot: Färbung von Insulin mittels Antikörper von DakoCytomation.

Orange: Co-Färbung von Insulin und CMKLR1 oben beziehungsweise Insulin und Chemerin unten.

Takahashi et al zeigten so die Koexistenz von Chemerin und Insulin, wie auch von CMKLR1 und Insulin in β -Zellen.¹

Im Jahr 2011 publizierten Takahashi et al. Untersuchungen zur Funktionalität von Chemerin. Die Rolle von Chemerin im Rahmen der Glukosehomöostase wurde dabei untersucht. Hierbei wurde am Mausmodell wie auch im *in vitro* Experiment mit Min6-Zellen (β -Zelllinie) demonstriert, dass Chemerin einen Einfluss auf die Insulinsekretion aufweist. So wird gezeigt, dass unter Abwesenheit von Chemerin keine adäquate Insulinsekretion im Tier- wie auch Zellversuch hervorgerufen werden kann. In diesem Zusammenhang gelang eine Co-Färbung von Insulin und CMKLR1, welche auch auf Gewebeebene darstellt, dass Chemerin Einfluss auf die β -Zellen nehmen kann (vgl. Abbildung 3) Aufbauend auf diesen Experimenten geht die Forschungsgruppe davon aus, dass β -Zellen ein *Target* für Chemerin darstellen.¹ Ebenfalls von dieser Annahme ausgehend wurde in unserem Labor versucht, diese Färbung an humanen Präparaten von Inselzellen zu reproduzieren, um in der Zellkultur an die Experimente mit Min6-Zellen von Takahashi et al.. anknüpfen zu können. Eine Kolokalisation von Insulin und



CMKLR1 gelang jedoch nicht, es zeigte sich viel mehr eine Koexistenz von Glukagon produzierenden α -Zellen und CMKLR1 (Abbildung 4). Dies lieferte einen neuen Ansatzpunkt für die Untersuchung der Funktionalität von Chemerin und seinem Rezeptor CMKLR1.

Abbildung 4 Immunfluoreszenz-Analyse von CMKLR1, Somatostatin, Glukagon und Insulin in humanen Inselzellen.

Mit Hilfe zweier unterschiedlicher CMKLR1-Antikörper konnte diese Färbung mehrfach verifiziert und bestätigt werden. Es zeigte sich eine Expression von CMKLR1 auf Glukagon-positiven α -Zellen des humanen Pankreasgewebes.

4.5 Chemerin und Tumore

Soll ein bestimmtes Gewebe gezielt und selektiv mit einem systemisch verabreichten Wirkstoff, sei es zum Beispiel ein Medikament oder auch eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, behandelt werden spricht man von *Drug Targeting*. Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Gewebe um einen Tumor, verwendet die Wissenschaft den Begriff *Tumortargeting*. Im Rahmen des Tumortargetings taucht Chemerin als Ligand und CMKLR1 als Angriffspunkt von Tumorgewebe in einigen

Studien auf. In verschiedensten Tumor-Zelllinien konnte die Genexpression von CMKLR1 nachgewiesen werden. So publizierten Pachynski et al. 2012, dass die Behandlung mit Chemerin im Mausmodell das Tumorwachstum von malignen Melanomen reduzierte. Eine tumorsuppressive Wirkung von Chemerin durch die Rekrutierung von NK-Zellen (Chemoattraktant) wurde gezeigt.⁶⁰ Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte Justa Friebus an in Mäusen implantierten Zelllinien des

Kolorektalen Karzinoms eine Zunahme der Tumorgröße unter Therapie mit Chemerin-CG-34 im Mausmodell dokumentieren (publiziert in ihrer Dissertation 2013). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers konnte der Rezeptor in unserer Arbeitsgruppe im ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (und ebensolchen Zelllinien), sowie in pankreatischen Tumoren nachgewiesen werden.⁶¹ Online-Datenbanken dokumentieren das Vorhandensein von CMKLR1 in den Tumorzelllinien MDA-MB-231, SW13, U87 MG, AGS, HAT-29, PL45 und DU4475 (www.GTEXPortal.org; www.BioGPS.org). Es stellt sich die Frage ob Chemerin über seine Rezeptoren Wachstum, Invasion, Migration, Metastasierung oder Sekretion von Tumorzellen beeinflusst. Andere Gruppen wie zum Beispiel Shin, Zabel und Pachynski haben weitere Hinweise auf eine Rolle von Chemerin und CMKLR1 in diesen Prozessen der Tumorentwicklung gefunden.⁸⁸ Darüber hinaus sollten weiterführende Studien klären, ob Chemerinanaloga für eine antiproliferative/antimetastatische Therapie oder in der Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden könnten.

4.6 Die Chemerin-Rezeptoren CCRL2 Und GPR1

Neben CMKLR1 gelten auch zwei weitere Rezeptoren als Chemerin-bindend. *C-C chemokine receptor-like 2* (CCRL2) und *G protein-coupled receptor 1* (GPR1) binden ebenso Chemerin. Beide Rezeptoren binden Chemerin mit ähnlicher Affinität,^{62,63} während an CCRL2 neben Chemerin auch die Chemokine CCL2, CCL5, CCL7, CCL8 sowie CCL19 binden,⁶³ ist für GPR1 kein weiterer Ligand bekannt. Die physiologischen Funktionen beider Rezeptoren sind noch weitestgehend unbekannt. 2014 wurde ein Einfluss von GPR1 auf den Glukosemetabolismus von Mäusen gezeigt, indessen Untersuchungen von CCRL2 vermuten lassen, dass dieser Rezeptor Chemerin bindet, um es für eine benachbarte Zelle mit CMKLR1 bereitzustellen.^{64,65} Die Aktivierung eines eigenen Signalwegs konnte durch die Bindung von Chemerin an CCRL2 bislang nicht nachgewiesen werden. Auch Gewebe, die diese Rezeptoren exprimieren müssen für weiterführende Experimente analysiert werden. Es ist bisher bekannt, dass GPR1 in Zellen von Leber, Niere, Darm und zentralem Nervensystem vorkommen.^{64,66} CCRL2 wurde in Zellen der Milz, des Herzens, in Endothelzellen der Lunge sowie in Leukozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Mastzellen und dendritischen Zellen nachgewiesen.^{63,67,68}

4.7 Ziele dieser Arbeit

Zur Therapieoptimierung im Rahmen des Metabolischen Syndroms gehört auch die suffiziente Behandlung der Insulinresistenz. In diesem Zusammenhang präsentieren viele Studien eine ungünstige Wirkung von Chemerin in seiner Rolle als Adipokin. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bisher nicht geklärt. Um das Therapiespektrum der Insulinresistenz zu erweitern und zu verbessern, sollte das Glukagon-System als Parameter nicht außer Acht gelassen werden. Dass die Zellen des Pankreas CMKLR1 exprimieren, bot mit Hilfe dessen Liganden Chemerin einen Forschungsansatz. Im *in vitro* Modell sollte in dieser Arbeit untersucht werden ob die Glukagonsekretion der β -Zellen durch Chemerin beeinflusst werden kann.

Um die Funktion des CMKLR1 weiter zu analysieren ist es wichtig *in vivo* und *in vitro* Modelle zu etablieren, in denen dies stattfinden kann. Viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bieten durch hohe Affinität und Spezifität ihrer Liganden und gleichzeitige Überexpression in bestimmten Tumorgewebe gute Angriffspunkte für Therapie und Diagnostik. CMKLR1 ist einer von ihnen. Ebenso bindet sein Ligand Chemerin auch an CCRL2 und GPR1. In dieser Arbeit sollen humane Tumorzelllinien mit verschiedensten, aktuell erhältlichen Antikörper in mehreren Methoden auf die Expression der drei oben genannten Rezeptoren untersucht werden um sie dann in weiterführenden Experimenten, zur Entwicklung eines Tumortargeting-Ansatzes mit CMKLR1 verwenden zu können .

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

5.1.1 Substanzen für die Zellkultur

- Ciprobay Bayer Vital GmbH
(Leverkusen, DE)
- DMEM, 1 g/L Glukose Biochrom AG (Berlin, DE)
- DMEM, 4,5 g/L Glukose Biochrom AG (Berlin, DE)
- Fetal Bovine Serum (FCS) Biochrom AG (Berlin, DE)
- G 418-BC, 25.000 U/ mL Biochrom AG (Berlin, DE)
- GlutaMAX Gibco (Carlsbad, USA)
- Goat Serum Biochrom AG (Berlin, DE)
- Hank's Balanced Salt Solution Biochrom AG (Berlin, DE)
- Leibovitz's L-15 Medium Gibco (Carlsbad, USA)
- McCoy's 5A modified Medium Biochrom AG (Berlin, DE)
- Natriumpyruvat Biochrom AG (Berlin, DE)
- nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) Biochrom AG (Berlin, DE)
- PBS Dulbecco 1x, w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺ Biochrom AG (Berlin, DE)
- Quantum 263, mit L-Glutamin PAA (Pasching, AT)
- RPMI 1640 Medium Biochrom AG (Berlin, DE)
- RPMI 1640 Medium, glukosefrei Gibco (Carlsbad, USA)
- RPMI 1640 1x Medium mit 20 mM HEPES Biochrom AG (Berlin, DE)
- Trypsin/EDTA Solution 1x Biochrom AG (Berlin, DE)

5.1.2 Puffer und Lösungen

- Aceton Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
- Methanol Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
- Paraformaldehyd (PFA) Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
- PBS, pH 7,4 Biochrom AG (Berlin, DE)
- TritonX100 Biochrom AG (Berlin, DE)
- TWEEN_20 Biochrom AG (Berlin, DE)
- Puffer A I 0.3 M Tris + 20 % (v/v) Methanol
- Puffer A II 0.025 M Tris + 20 % (v/v)Methanol

5.1.3 Peptide

- Chemerin-9 H2N Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser OH
- Forskolin C22H34O7
- GLP-1 C186H275N51O59
- PMA C8H8HgO2
- L-Arginin C6H14N4O2
- Ghrelin C149H249N47O42

5.1.4 Kits

- ELISA Kit (Glukagon) von R&D Systems, Marburg, DE
- jetPEI™ Transfektionskit von Polyplus-Transfection, Illkirch Cedex, FR
- „RNeasy Plus Mini Kit“ mit Protokoll von QIAGEN, Hilden, DE
- *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AB)* mit DNaseI-Verdau von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
- Real-timePCR Kit mit TaqMan-Sonden von Roche, Basel, CH
 - MasterMix (Fast Start TaqMan Probe Master)
 - Primer+Probes (TaqMan Gene Expression Assays)

5.2 Enzyme

- Collagenase P von Roche (Basel, CH)
- DNase I von AppliChem (Omaha, USA)
- Liberase DL von Roche (Basel, CH)
- Phusion Hot Start *High-Fidelity* DNA Polymerase von Finnzymes (Rochester, USA)
- DNA-Restriktionsenzyme von New England Biolabs (Ipswich, USA)
- T4 DNA Ligase New England Biolabs (Ipswich, USA)

5.3 Antikörper und Oligonukleotide

5.3.1 Primäre Antikörper

- antiKI67 (positiv Kontrolle)
 - monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen murines KI67
 - # M7249; anti-mouse KI-67 CI TEC-3 ; Firma DAKO
 - IF-Zellen 1:50

- anti-Glucagon
 - Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Glukagon
 - # G2654; Klon K79bB10; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 - IF-Zellen: 1:2000
- anti-mCMKLR1
 - Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen murinen CMKLR1
 - # LS-C106194; Klon BZ194; Biozol (Eching, DE)
 - IF-Zellen 1:20
- anti-hCMKLR1
 - Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen humanen CMKLR1
 - # 10325; Cayman Chemical (Michigan, USA)
 - WB 1:10.000
- anti-hCCRL2
 - Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen humanes CCRL2
 - # HPA043238; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
 - WB 1:500

5.3.2 Sekundäre Antikörper

- GaM-Cy3
 - goat anti-Maus IgG + IgM (H+L)-Cy3
 - Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
 - IF-Zellen 1:1000
- GaRat-Cy2
 - goat anti-Ratte IgG (H+L)-Cy2
 - Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
 - IF-Zellen 1:400
- GaR-POD
 - goat anti-Kaninchen IgG (H+L) gekoppelt mit Horseradish Peroxidase
 - Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
 - WB 1:10.000
- anti-c-myc-Tag 9E10
 - monoklonal anti-Maus
 - Becton-Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
 - IF-Zellen 1:500

5.3.3 Primer und Probes für die qPCR

- Primer (Hs01081979 von Invitrogen)
- huGAPDH: VIC-markierte (#4326317E-1105051 von AB)
- huCMKLR1 (05532957001 von Roche)
- huCCRL2 (von Life Technologies)
- huGPR1 (von Sigma-Aldrich)

5.4 Zellkultur

5.4.1 Zellen und Kultivierung

In den Stimulationsversuchen zu Glukagon und Chemerin wurden α -Zellen von Hamster (INR1G9 Zellen, im Weiteren INR genannt) und Maus (α TC1) verwendet. Von den α TC1 Zellen wurden drei verschiedenen Klone untersucht, der ursprüngliche Klon α TC1 parental (α TC1 p.), sowie die Klone 9 (α TC1 c9) und 6 (α TC1 c6).

Die INR Zellen wurden in RPMI 1640 Zellkulturmedium der Firma Biochrom AG, DE kultiviert. Dem Zellkulturmedium wurde 10 % fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt, es enthält final 11,1 mM Glukose. Alle α TC1 Zellen wurden in, mit 20 % FCS versetztem, DMEM Zellkulturmedium der Firma Biochrom AG, DE kultiviert. Dieses Medium enthält 25,0 mM Glukose. Das in dieser Arbeit verwendete FCS wurde von der Firma Biochrom AG, DE bezogen.

Neben den für die Stimulationsversuche verwendeten Zellen befanden sich im Rahmen der Rezeptoranalyse noch weitere Zellen in Kultur. Darunter die humanen Tumorzelllinien AGS, BON, CM17, DU4475, NIC-H727, HT-29, MDA-MB-231, PL45, SK-MEL-1, SW13, U-2 OS, U-87 MG und HEK 293A. Sowie die Nager-Tumorzelllinien RBL-1 (Ratte) und P3X63Ag8 (Maus). In dem o.g. RPMI Medium wurden unter Zusatz von 10 % FCS folgende Zellen kultiviert: HEK 293A, AGS, Bon, HT-29, DU4475, U-87 MG. Dem Zellkulturmedium der beiden letztgenannten Zelllinien wurden nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA – Biochrom AG) und Natriumpyruvat (NaPyr – Biochrom AG) hinzugefügt. Ebenfalls o.g. RPMI Medium erhielten die Zellen der Linie CM17 und P3X63Ag8, hier wurde 5 % (CM17) und 10 % (P3X63Ag8) FCS und 2 mM L-Glutamin hinzugefügt. Die SK-MEL-1 Zellen wurden in o.g. RPMI Medium unter Zusatz von 20 % FCS kultiviert. Im ebenfalls o.g. DMEM Medium wurden die Zelllinien NIC-H727, RBL und PL45 mit 10 % FCS kultiviert. Für die Kultur der SW13 Zelllinie wurde DMEM/Ham's F-12-Medium 1:1 (Biochrom AG, DE) mit dem Zusatz von 10 % FCS

verwendet. McCoy's5A Modified-Medium (Biochrom AG, DE) unter Zusatz von 10 % FCS wurde für die Zelllinie U-2 OS verwendet. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde in Leibovitz's L-15 Medium (Gibco, USA) mit 20 % FCS kultiviert. Alle Zelllinien wurden im Inkubator (Labotect, DE) bei 37 °C in einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen mit Angaben zu deren Herkunft und Bezeichnung. Die Tabelle ist alphabetisch nach Zelllinie sortiert.

Zelllinie	Gewebe/Tumor	Quelle, Bezugsnummer	Eigenschaft in Zellkultur	Organismus, Morphologie
AGS	Adenokarzinom, Magen	ATCC, CRL-739	Adhärent	Human, Epithel
BON	Neuroendokriner Tumor d. Pankreas	Labor Yow-Jiun Jeng, Uni Texas ⁶⁹	Adhärent	Human
CM17	Insulinom	Labor Baroni Uni Rom ⁷⁰	Adhärent, teils schwimmend	Human
DU4475	Mammakarzinom Metastase: Hautkarzinom der Brustdrüse	ATCC, HTB-123	Suspension, Aggregate	Human, Epithel
HEK 293A	Embryonales Gewebe der Niere	ATCC, CRL-1573	Adhärent	Human, Epithel
HT-29	Kolorektales Adenokarzinom	ATCC, HTB-38	Adhärent	Human, Epithel
INR	Insulinom ⁷¹	Labor Wulbrand Uni Marburg	Adhärent	Hamster
MDA-MB-231	Adenokarzinom der Brustdrüse	ATCC, HTB-26	Adhärent	Human, Epithel
NIC-H727	Lunge, Bronchialkarzinom	ATCC, CRL-5815	Adhärent	Human, Epithel
P3X63Ag8	Plasmozytom, Myelom der B-Zell Reihe	ATCC, TIB-9	Suspension	Maus, Lymphoblast
PL45	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	ATCC, CRL-2558	Adhärent, teils schwimmend	Human, Epithel

RBL-1	Leukämie, peripheres Blut	ATCC, CRL-1378	Suspension	Ratte, Lymphoblast
SK-MEL-1	Malignes Melanom der Haut	ATCC, HTB-67	Cluster in Suspension	Human, sphärisch
SW13	Grade IV, primäres Kleinzellkarzinom des Nebennierenkortex	ATCC, CCL-105	Adhärent	Human, Epithel
U-2 OS	Osteosarkom	ATCC, HTB-96	Adhärent	Human, Epithel
U-87 MG	Glioblastom; Astrozytom	ATCC, HTB-14	Adhärent	Human, Epithel
α TC1 c6	Pankreasadenom der α -Zellen	ATCC, CRL-2934	Adhärent	Maus, Epithel
α TC1 c9	Pankreasadenom der α -Zellen	ATCC, CRL-2350	Adhärent	Maus, Epithel
α TC1 p.	Pankreasadenom der α -Zellen	Labor Phillippe, Uni Genf	Adhärent	Maus, Epithel

Tabelle 1 – Übersicht verwendeter Zelllinien

5.4.2 Stabile Transfektion

Die HEK 293A Zellen wurden für einige Versuche mit mCMKLR1-myc (CMKLR1 der Maus, gekoppelt an myc) transfiziert. Dies erfolgte nach Herstellerprotokoll der Firma POLYPLUS-TRANSFECTION mittels jetPEI™ Reagenz zur Transfektion in Säugerzellen. Es wurde streng nach dem Protokoll für adhärenente Zellen vorgegangen, die Reagenzien wurden wie angegeben verwendet und erstellt.

5.5 Analyse von Zellkulturüberständen

5.5.1 EC50 Forskolin

Um in den folgenden Experimenten mit suffizienten Dosen von Forskolin arbeiten zu können wurde zunächst für die in dieser Arbeit benutzte Methode des ELISA die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von Forskolin bestimmt. Auf zunächst, wie zu den Stimulationsversuchen beschrieben, ausgesäten INR Zellen wurde eine Forskolin-Titration vorgenommen, es wurde im 96 well Format gearbeitet und für 60 min bei 37° C inkubiert. Beginnend bei 30 μ M wurde einer Verdünnung von 1:3 bis 0,06 μ M vorgenommen, die Verdünnung erfolgte mit dem, in diesem Versuch verwendeten, RPMI 1640 Medium und einer Forskolin-Stammlösung von 10mM in 100% EtOH.

Daraus ergaben sich 12 verschiedene Verdünnungen für die jeweils 6 Replikate angelegt wurden. Nach der Analyse mittels ELISA wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kurvenfitting) die EC_{50} abgeleitet. Die Datenanalyse erfolgte mittels Graph Pad.

5.5.2 SekretionsAssays mit pankreatischen α -Zellen (Nagerzelllinien)

Zur späteren Analyse der Hormonsekretion wurden INR-Zellen und α TC1 Zellen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt, die Zellkulturüberstände gesammelt und auf ihren Glukagon-Gehalt hin untersucht.

Dazu wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau in Zellkultur-Platten unterschiedlicher Größe ausgesät, nachdem sie, wie o.g., in optimalen Bedingungen kultiviert wurden. Die Konfluenz sollte am Versuchstag zwischen 70 und 90 % liegen. Die Zellen wurden über Nacht im o.g. Inkubator bebrütet, das Medium wurde mit 0,05 % NEAA, wie auch mit 10 % FCS versetzt. Am Folgetag wurden die Zellkulturüberstände, teilweise nach erneutem Mediumwechsel abgenommen. Die Inkubation erfolgte stets in Medium, welches mit 0,05 % NEAA und 0,5 % BSA versetzt wurde, FCS wurde hier nicht hinzugefügt. Bei 800 g wurden die Überstände anschließend in speziellen 96 *deep-well* V-Bottom Platten drei Minuten zentrifugiert, um letzte Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen und in 96 *well* U-Bottom Platten bei -20 °C eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

5.6 Molekularbiologie

5.6.1 Präparation von mRNA

Zur Analyse mittels qPCR wurde zunächst aus den zu untersuchenden Zelllinien RNA isoliert. Dies geschah nach Hersteller Angaben mit dem „RNeasy-Protocol“ der Firma QIAGEN. Die kultivierten Zellen wurden dazu aus Ihren Kulturschalen abtrypsiniert, in 1 ml PBS resuspendiert, bei 900 rpm für 3 min zentrifugiert und anschließend wie im Hersteller Protokoll beschrieben mit den zum Kit gehörigen Lysaten, Säulen und Puffern behandelt. Die schließlich gewonnene mRNA wurde bei -80°C in den zum Kit gehörigen Reaktionsgefäßen gelagert.

5.6.2 Präparation von cDNA

Nach der Erfolgreichen Präparation der mRNA wurde diese mit Hilfe des „Reverse Transcription Kits“ der Firma Sigma (#AMDP1) in cDNA umgeschrieben. Streng nach den Vorgaben des Herstellers wurde zunächst ein DNase-Verdau und im nächsten Schritt die *reverse* Transkription durchgeführt. Die cDNA wurde auf eine

Endkonzentration von 50 ng/µl (auf der Basis der eingesetzten RNA-Menge) eingestellt. Es wurden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen Negativkontrollen erstellt, die statt mit reverser Transkriptase mit Wasser (RNase-frei, im Kit inbegriffen) versetzt wurden.

5.6.3 Quantitative real-Time Polymerasekettenreaktion – qPCR

Es wurde wie unter Kapitel 5.1.4 vermerkt, von der Firma Roche zur TaqMan-Anwendung das Fast Start TaqMan® Kit mit MasterMix, Primer und Probes verwendet. Die Sonden für die zu analysierenden Ziel-Gene waren mit FAM markiert, jene für die *housekeeping*-Gene als endogene Kontrollen mit dem Farbstoff VIC. Der Ansatz für ein *well* (*Hard-Shell Low-Profile Thin-Wall 96-well Skirted* PCR Platten von Bio-Rad) in der Analyse setzte sich aus je 5 µl MasterMix, 2 x 0,5 µl Primer (*Gene of interest* und *housekeeping*-Gen (GAPDH), Konzentration 10 µM) und 4 µl in Wasser (H₂O im Kit enthalten, nukleasefrei) verdünnter cDNA zusammen. Die cDNA enthielt eine Endkonzentration von 30 ng/µl. Es wurde stets eine Negativ-Kontrolle (*no template control*) mitgeführt, diese enthält das im Kit enthaltene Wasser (4 µl) anstelle von cDNA. Es wurde mit einer 3-fach-Bestimmung (Triplikate) gearbeitet, pipettiert wurden die Ansätze auf Eis. Die Platten wurden mit einer Klebefolie (*Microseal ,B' Adhesive Optical Seal* von Bio-Rad) abgedichtet. Nach einem kurzen Vortexen wurden die Platten 1 min bei 800 g zentrifugiert und mit dem Bio-Rad CFX96 Real-Time-System amplifiziert. Dabei wurde zunächst eine Vor-Inkubation zur initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min vorgenommen. Anschließend folgte die Amplifizierung in drei Temperatur-Schritten, 10 s 95 °C, dann 45 Zyklen zu je 30 s Messung mit 60 °C und 1 s 72 °C. Zuletzt fügte sich eine Kühlungs-Phase für 30 s bei 40 °C an. Die Auswertung wurde mittels qBase PLUS nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode vorgenommen. Dazu wurde in einem ersten Schritt die gemessenen Zyklen (quantitation cycle = C_q) der Triplikate für je das *gene of interest* und das *housekeeping*-Gen gemittelt. Danach erfolgte die Berechnung des ΔC_t . Dazu wurde die gemittelte C_q des *housekeeping*-Gens vom *gene of interest* subtrahiert. Für einen nun folgenden Normierungsschritt erfolgt die Berechnung des Mittelwertes aller C_q-Werte des *housekeeping*-Gens. Ein C_q-Wert von 34 wird genutzt um die Expression des *housekeeping*-Gens zu normieren, in dem der gerade genannte Mittelwert der jeweiligen C_q-Werte aller *housekeeping*-Gene von 34 subtrahiert wird, da sich in den hier präsentierten Versuchen auch in der Expression des GAPDH eine gewisse Variabilität zeigt. Insgesamt wurden Analysen für drei *genes of interest* durchgeführt, nämlich CMKLR1, CCRL2 und GPR1. Jedes Datenvolumen verfügt also über einen

individuellen Normierungswert, welcher zur Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Werts genutzt ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{individueller Normierungswert}$) wird. Dieser liegt für CMKLR1 bei 17,17, für CCRL2 bei 17,81 und für GPR1 bei 17,05. In einem letzten Rechenschritt wird die *normalized expression ratio* mit $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet. Ist die ΔCt besonders groß ergibt sich eine geringere Expression des *gene of interest*. Eine RQ von 1 als *cut off* – Wert für eine funktionell relevante Genexpression ist nach dieser Normierungsmethode ein relativer Wert, der große Differenzen zwischen Cq des *housekeeping*-Gens und des *gene of interest* ebenfalls berücksichtigt. Dennoch repräsentieren RQ-Werte nahe 1 damit eine Zelllinie nahe der 1-fachen Expression (Cq 34). Die Berechnungen erfolgten im Tabellenprogramm Excel.

5.7 Immunfluoreszenz

Um die untersuchten Rezeptoren sichtbar zu markieren wurde die Immunfluoreszenzanalyse genutzt. Hierzu wird an die Zielproteine, nach Fixierung der sie beinhaltenden Zellen, ein spezifischer Erstantikörper gebunden, der anschließend durch einen Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper detektiert wird.

Am Tag vor der Fixierung wurden die zu untersuchenden Zellen in 6-*well*-Platten mit einer Konfluenz von 40 % auf Deckgläschen ausgesät. Am Versuchstag wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen wurden fixiert. Die Suspensionszellen (RBL-1 und P3X63Ag8) wurden in ihrem Medium resuspendiert, 50 μ l wurden in die Cytospin-Pipe pipettiert. Mithilfe des Cytospin wurden die Zellen (2 min bei Speed: 1.200 rpm) auf den Objektträger aufgebracht. Der Zellpunkt wurde anschließend mit einem Fettstift umrandet. Die weitere Methodik ist identisch zu den adhärenen Zelllinien.

Für eine Fixierung mit 4 % gepuffertem Formalin wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und für 10 min in Formalin fixiert. Ein kurzer Waschschrift in PBS schloss sich an. Für erneute 10 min wird eine PBS Lösung, mit 0,1 % TritonX100 versetzt, aufgetragen, anschließen erfolgte wieder ein kurzes Waschen mit PBS.

Für eine Methanol/Aceton-Fixierung (1:1) wurden die Zellen für 2 min in der Methanol/Aceton-Lösung inkubiert und anschließend luftgetrocknet.

Die Blockierung freier Proteinbindungsstellen erfolgte für 60 min in, mit Ziegenserum (5 %) versetztem PBS. Auf dem feuchten Tablett wurde dann der entsprechende Primär-Antikörper (Konzentrationen s. je Versuch in der zugehörigen Beschreibung) in einer mit

0,1 % BSA versetzten PBS Lösung mit je 30 μ L pro Deckgläschen aufgetragen. Nach Ablauf einer einstündigen Inkubation im Kühlschrank erfolgte ein Waschschrift. Hierbei wurden die Deckgläschen dreimal für fünf Minuten in PBS eingetaucht. In selbigem Prozedere wurde dann der sekundäre Antikörper aufgetragen, mit ebenso selbiger Waschung nach einer Stunde Inkubation. Für die finale Fixierung wurden die Deckgläschen für 20 sec in Ethanol eingetaucht und anschließend 20 min luftgetrocknet. Das Eindecken auf dem Objektträger erfolgte mit Immu-Mount Kleber (Thermo Scientific, USA).

5.8 Proteinbiochemie

5.8.1 Western Blotting

Um das Verfahren des Western Blottings zu nutzen wurden zunächst auf Eis Zelllysate hergestellt. Die kultivierten Zellen mit einer Konfluenz von etwa 80 – 90 % wurden kurz mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 1-2 min mit Lysis-Puffer lysiert und vorsichtig von der Kulturschale geschabt. In einer QIAshredder-Säule wurde das Lysat für eine Minute bei 25.000 x g zentrifugiert und so homogenisiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Proteinkonzentration der gewonnenen Lysate wurde in einem nächsten Schritt nach genauen Herstellerangaben mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) festgestellt. Mit der SoftMax Pro 5.3 Software konnte die Konzentration dann in der Standardkurve errechnet werden.

In SDS-Polycrylamidgelen wurden die Proteine im Elektrophoreseverfahren mit dem TRIS-Tricine-Puffersystem (Mini – PROTEAN System von Bio Rad) getrennt. Zwei Gele wurden verwendet, das Sammelgel (10 min bei 80 V) und das Trenngel (1 h bei 120 V). Zusammensetzung Sammelgel: Polyacrylamid (Acrylamide/Bisacrylamide 29:1) - 4 % (v/v), SDS - 0,1% (w/v), Tris-HCl pH 8,45 - 0,72 M, APS - 0,1 %, TEMED - 0,089 %. Zusammensetzung Trenngel: Polyacrylamid (Acrylamide/Bisacrylamide 29:1) -10 % (v/v), SDS - 0,1% (w/v), Tris-HCl pH 8,45 - 1 M, APS - 0,1 %, TEMED - 0,089 %. Als Proteingrößenmarker dienen der Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad) beziehungsweise der Kaleidoscope Precision Plus Protein (Bio-Rad). Mittels Coomassie-Färbung wurden die aufgetrennten Proteine visualisiert. Die Gele wurden nach der SDS-PAGE kurz in Wasser gelegt und dann für 3 min in Coomassie-Fixierlösung und danach für 30 min in Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Danach folgte für 3

min wieder eine Inkubation in Coomassie-Fixierlösung. Zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff wurden die Gele über Nacht in Wasser gelagert.

Auf Nitrozellulosemembranen erfolgte der Western-Blot im Semi-dry-Verfahren. Das Gel wurde in K-Puffer und die Membranen und Filter in die Puffer gelegt. Es wurden folgende Schichten gelegt (von unten [= Anode] nach oben [= Kathode]): zwei Filter in AI-Puffer, ein Filter in All-Puffer, Nitrozellulosemembran (Whatmann 0,45 µm Protan BA 85, GE Healthcare, Waukesha, USA) in All-Puffer, Gel in K-Puffer und zwei Membranen in K-Puffer. Es wurde die TRANSBLOT SD – Apparatur von Bio-Rad verwendet. Für eine Stunde wurde ein konstantes elektrisches Feld mit 3 mA/cm² angelegt und die Membran anschließend in 5 % PBS-T geblockt. Die Primärantikörper wurden in PBST-M verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membranen wurden dann dreimal für mindestens 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS-T erfolgte die Detektion mit dem ECL West Dura-Kit von Pierce. Die Chemolumineszenz erfolgte mit dem VersaDoc Imaging System von Bio Rad und die Auswertung densitometrisch. Für die Detektion eines zweiten Proteins auf dem gleichen Blot (z.B. GAPDH als Housekeeping), wurden die zuvor gebundenen Antikörper (AK) der ersten Analyse durch die Inkubation mit Stripping-Puffer (30 min) von ihren Bindestellen entfernt. Nach zwei intensiven Waschschritten mit PBS-T erfolgte die Blockierung mit PBST-M (1 h, RT). Die folgenden Schritte sind identisch zur ersten Protein-Detektion.

5.8.2 ELISA

Zur Analyse der Glukagonkonzentrationen nach den Stimulationsversuchen wurde das DuoSet ELISA Kit mit der Seriennummer DY 1249 von der Firma R&D Systems benutzt. Es wurde streng nach Anleitung des Kits vorgegangen. Im Kit enthalten sind *Capture Antibody* (Part 842985), *Detection Antibody* (Part 842986), *Standard* (Part 842987) und Streptavidin-HRP (Part 890803). Zusätzlich wurden ein *Wash Buffer* mit 0.05 % Tween_20 in PBS (pH von 7,2 – 7,4) angesetzt, sowie ein *Reagent Diluent* mit 1 % BSA (proteasefrei) in PBS (pH 7,2 – 7,4). Das Reagenz *Substrate Solution* wurde von der Firma ThermoFischer SCIENTIFIC bezogen (1-Step™ Ultra TMB-ELISA). 2 N H₂SO₄ diente als *Stop Solution*. Als Referenz bei der Messung wurde stets eine Verdünnungsreihe mit Standard (4 – 2 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0 ng/mL Glukagon) mit je zwei Replikaten auf jeder Platte aufgetragen und mitgeführt. Beide

Antikörper wurden mit einer Arbeitskonzentration von 1:60 und Streptavidin 1:200 aufgetragen. Nach der Präparation der Platten in den Waschschrritten laut Kit erfolgte die Messung im ELISA-Reader (Spektrometer: SPECTRA max Plus 384 von Molecular Devices). Die erste Messung erfolgte 20 min nach Auftragen der *Substrate Solution* (Inkubation laut Kit 20 min bei Raumtemperatur) bei 640 nm. Anschließend wurde die *Stop Solution* aufgetragen und eine zweite Messung bei 452 nm vorgenommen. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen stets die Werte der ersten Messung. Die Proben wurden wie folgt verdünnt: INR 1:3, α TC1 Zellen 1:10.

5.9 Datenanalyse

Um über die verschiedenen Versuche zur Glukoseseekretion hinweg eine einheitliche Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu erhalten wurde eine rechnerische Normierung vorgenommen. Hierzu wurden die Messergebnisse tabellarisch im Programm Excel erfasst. Mit Hilfe der Tabellenkalkulation konnten dann die Mittelwerte der einzelnen Replikate erstellt werden. Diese wurden dann anschließend prozentual zu allen mitgeführten Replikaten normiert, in dem die zugehörige, mitgeführte Kontrolle als Referenz galt. Daraus ergab sich die Rechnung $100 / \text{Mittelwert der Kontrolle} * \text{Mittelwert der Probe}$. Um eine vergleichbare Darstellung der Ergebnisse aller drei Experimente, die in Abbildung 9: INR-Zellen im Sekretions-Assay mit Vorinkubation unterschiedlicher Substanzen. Chemerin-9 1 μM , Forskolin 0,06 μM . Vorinkubation 20 min, Inkubation 60 min. $n = 2-3$, 96 *well*. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus drei unabhängigen Experimenten, mit je 6 Replikaten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. ANOVA (One-way analysis of variance) zur Signifikanzanalyse mit $p < 0,05$ und Tukey's Multiple Comparison Test als Post-Test zur Analyse zwischen Probe und der Kontrolle A. Die nebenstehende Legende erklärt welche Probe mit welcher Substanz während Vorinkubation und Inkubation behandelt wurde. Es zeigt sich eine signifikant höhere relative Sekretion in der mit Forskolin behandelten Gruppe C. Die Gruppe B, mit Chemerin behandelt, wies eine ähnliche relative Glukagonsekretion auf wie die Mediumkontrolle A. Gruppe D zeigt eine ähnliche relative Glukagonsekretion wie Gruppe C, jedoch konnte hier im Vergleich zu Mediumkontrolle keine Signifikanz berechnet werden. Die ohne Vorinkubation 1 h mit Forskolin und Chemerin gleichzeitig inkubierten Zellen der Gruppe E wiesen eine geringere relative Sekretion von Glukagon auf als die Gruppen C und D, und im Vergleich zu Gruppe A und B eine höhere relative Sekretion. zusammengefasst wurden, zu erreichen wurde

eine Normierung vorgenommen. Dabei wird die Glukagonkonzentration im Überstand der als Kontrolle fungierenden, unbehandelten (Inkubation und Vorinkubation in reinem RPMI-Medium) Probe A als 100 % angesehen und die Glukagonkonzentration im Überstand der behandelten Proben B bis F in Prozent aufgeführt.

Zur graphischen Darstellung der Daten dieser Arbeit in Balkendiagrammen wurde GraphPad Prism 5.04 verwendet. Die via Excel normierten Daten der Glukagonsekretionsversuche und die der qPCR wurden dafür tabellarisch in GraphPad erfasst und vom Programm in die graphische Darstellung transferiert, die Formatierung von Farbe und Schriftart erfolgte manuell.

Die Signifikanzanalyse wurde ebenso mittels GraphPad durchgeführt. Nach Eingabe der Daten wurde je nach Anzahl der vorliegenden Proben-Gruppen die ANOVA (One-way analysis of variance) oder auch bei lediglich zwei zu vergleichenden Gruppen der t-Test angewendet.

6 Ergebnisse

6.1 INR-Zellen

Die hier verwendete Zelllinie INR ist eine Nager-Tumorzelllinie und entstammt aus dem Hamster, sie wird auch INR1G9 genannt. Wie in der Literatur beschrieben, ist sie bekannt für ihre Glukagonsekretion und ihr α -Zell-typisches Verhalten. Sie kann laut verschiedener Gruppen^{71,89,90} als Modell zur Analyse von Glukagonsekretionsmechanismen genutzt werden. Das oben beschriebene, in unserer Arbeitsgruppe bestätigte, Vorkommen des Chemerin bindenden Rezeptors CMKLR1 auf Glukagon-positiven α -Zellen in Zusammenschau mit der von Takahashi *et al.* präsentierten Koexistenz von Chemerin und Insulin, wie auch von CMKLR1 und Insulin in β -Zellen, lässt auf einen möglichen, auch physiologischen Angriffspunkt des Chemerin/CMKLR1 im Stoffwechselsystem schließen. Es bleibt zu klären, ob Chemerin über CMKLR1 die Glukagon- oder die Insulinsekretion beeinflusst. Die in dieser Arbeit präsentierten *in-vitro*-Versuche sollen einen Zusammenhang zwischen Glukagonsekretion und Chemerin-Behandlung der aufgeführten Zelllinien untersuchen.

6.1.1 Vorversuch - Bestimmung der EC₅₀ für Forskolin

Um zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Zellen auf eine sichere positiv-Kontrolle zu testen wurde Forskolin verwendet. Aus der Literatur ist Forskolin als Substanz bekannt, die die Glukagonsekretion anregt. In dieser Funktion wurde Forskolin auf INR-Zellen getestet. Um darüber hinaus in möglichen Inhibitionsversuchen mit der optimalen Konzentration von Forskolin arbeiten zu können, wurde die EC₅₀ bestimmt. Gleichzeitig konnte mit diesem Vorversuch bestätigt werden, dass die vorliegenden Zellen in dem unter Methoden beschriebenen Versuchsaufbau wie in der Literatur vermerkt auf Forskolin mit einer Glukagonsekretion reagieren. Aus den in Abbildung 5 gezeigten Werten ergibt sich eine mittlere effektive Konzentration von 0,062 μ M für die Stimulation der INR-Zellen zur Glukagonsekretion, die in den einigen Versuchen anschließend verwendet wurde.

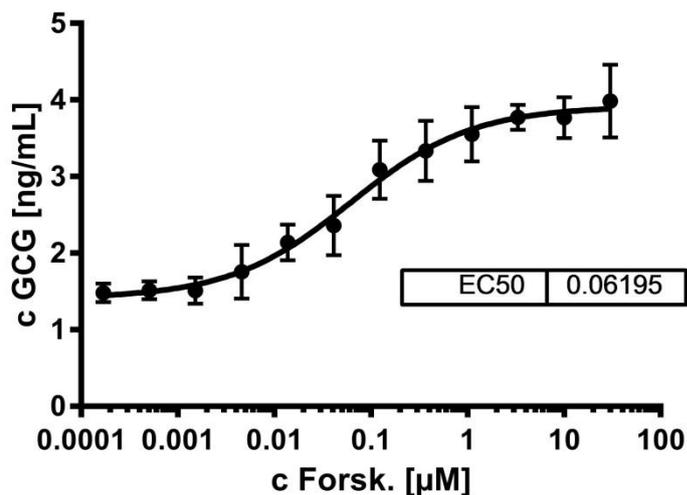


Abbildung 5: Kurvenfitting zur Ableitung der EC_{50} im Glukagon-Sekretions-Assay mit INR-Zellen mit unterschiedlichen Forskolinkonzentrationen (Titration) im Zellkulturmedium. $N = 1$, Inkubationszeit 1 h, 96 well, Mittelwerte mit Standardmessfehler aus je sechs Replikaten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

6.1.2 Einfluss unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Glukagonsekretion

Um grundlegende Informationen über die in den folgenden Versuchen verwendeten INR-Zellen zu gewinnen, wurde als erstes die basale Glukagonsekretion in drei verschiedenen Glukosekonzentrationen des Zellkulturmediums analysiert. Ein Abfall des Plasmaglukoselevels unter die physiologische Grenze (hypoglykämische Bedingungen; $< 3,6$ mM) bewirkt die Sekretion des Hormons Glukagon.⁷²⁻⁷⁴ Inhibiert wird die Glukagonsekretion durch Hyperglykämie (Blutglukose nüchtern > 7 mM).⁷⁵⁻⁷⁷ Da eine hohe, eine mittlere und eine geringe Glukosekonzentration im Medium während der Inkubation verwendet werden sollte, wurde 1 mM (*low* Glucose), 5,6 mM und 25 mM (*high* Glucose) gewählt.

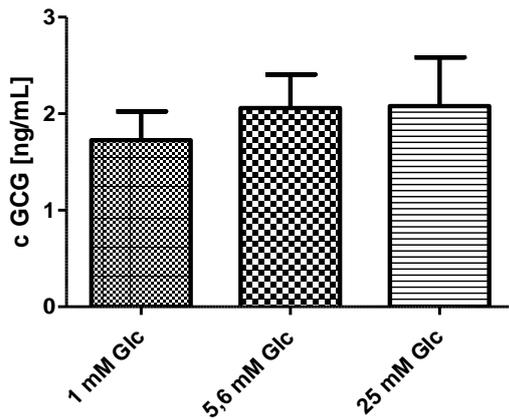


Abbildung 6: Glukagon-Sekretions-Assay mit INR-Zellen in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. N = 3, Inkubationszeit 3 h, 24 well. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. ANOVA (*One-way analysis of variance*), keine Signifikanz (kein Unterschied zw. den Gruppen).

Es wurden insgesamt drei unabhängige Experimente mit je drei Replikaten durchgeführt. Hierbei wurden die INR-Zellen in 25 mM Glukose im RPMI 1640 Medium, ausgesät und am Folgetag drei Stunden in den drei genannten Glukosekonzentrationen inkubiert. Abbildung 6 zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Glukagonproduktion zwischen den drei Gruppen. Die Zellen produzieren also trotz der unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Mediums ähnliche Mengen Glukagon und reagieren damit nicht physiologisch.

6.1.3 Glukagonsekretion unter Behandlung mit Forskolin

Forskolin ist in der Literatur als Stimulator der Glukagonsekretion bekannt. Dass sich die hier verwendeten Zellen, wie in der Literatur beschrieben,^{78,79} durch Forskolin zur Glukagonproduktion stimulieren lassen, ist durch den Vorversuch bereits anzunehmen. Die durch Forskolin hervorgerufene Stimulation der INR-Zellen zur Glukagonsekretion sowie die damit einhergehende Eignung als Positivkontrolle wurde ein weiteres Mal verifiziert. Dazu wurden die INR-Zellen eine Stunde unter Zusatz von 10 μ M Forskolin inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine unbehandelte Probe in standardmäßig verwendetem Zellkulturmedium mitgeführt (RPMI 1640).

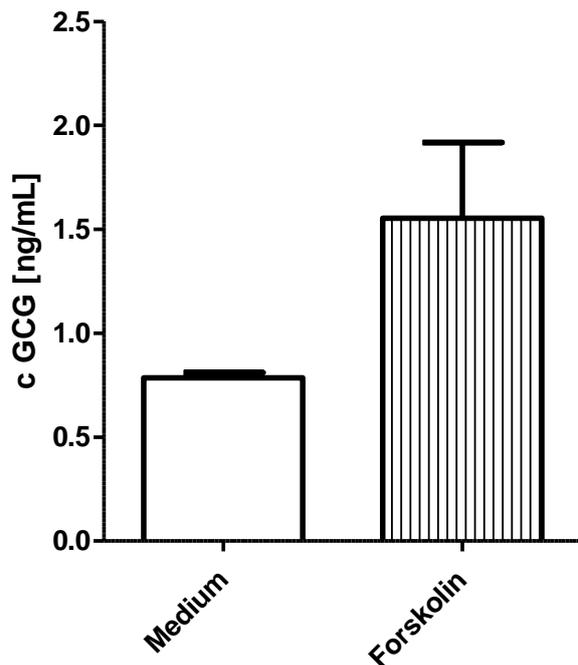


Abbildung 7: Stimulation der Glukagonsekretion in INR-Zellen mit Hilfe von Forskolin. N = 1 mit drei Replikaten pro Datenpunkt, 24 well. 1 h Substanzinkubation in 11,1 mM Glukose, Stimulation mit 10 μ M Forskolin. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Im Vergleich zur Mediumkontrolle wurden unter Behandlung mit Forskolin höhere Glukagonkonzentrationen in den Proben nachgewiesen.

Es wurde ein Experiment mit je 3 Replikaten pro Probe durchgeführt. Die Glukosekonzentration des in allen Proben verwendeten Zellkulturmediums betrug 11,1 mM. In Abbildung 7 ist eine deutlich höhere Glukagonsekretion unter Behandlung mit Forskolin zu sehen, als in der unbehandelten Mediumkontrolle.

6.1.4 Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin

Nach den vorangegangenen Versuchen, die das Verhalten der INR-Zellen in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und unter einer Behandlung mit Forskolin zeigten, wurde nun das Sekretionsverhalten der Zellen unter Zusatz von Chemerin untersucht. Da in der Literatur bereits Zusammenhänge zwischen Glukagonsekretion, Glukosekonzentrationen im Plasma, Chemerin und CMKLR1 angenommen werden (vgl. Einleitung), wurde die Glukagonsekretion der Zellen in diesem Versuch in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Mediums untersucht. So könnten etwaige Unterschiede der Sekretion von Glukagon unter Chemerin in Bezug auf die Glukosekonzentration des Mediums erfasst werden.

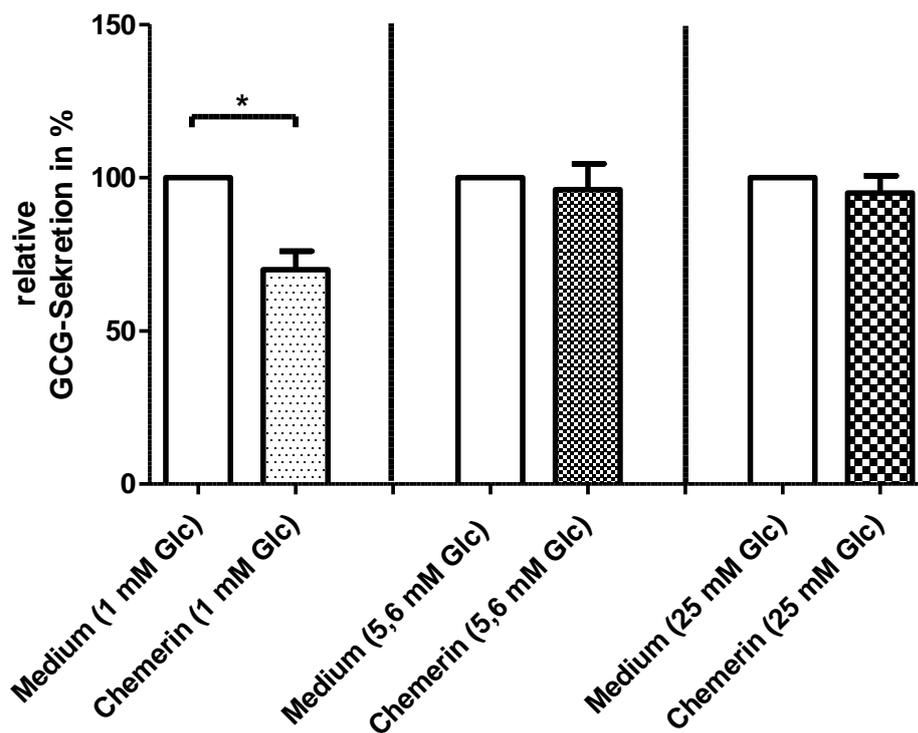


Abbildung 8: Behandlung der INR-Zellen mit Chemerin im Sekretions-Assay. Stimulation mit 1 μM Chemerin-9. Inkubation 3 h in drei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. N = 3, 24 *well*. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit je drei Replikaten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. T-Test zur Signifikanzanalyse zwischen Probe und der dazugehörigen Kontrolle mit $p > 0,05$ in der Gruppe 1 mM Glc. In der *low* Glucose Gruppe zeigt sich eine signifikant niedrigere Glukagonkonzentration unter Behandlung mit Chemerin im Vergleich zur Kontrolle. In den beiden anderen Gruppen wird eine ähnliche Glukagonkonzentration in allen Proben nachgewiesen.

Es wurde unter Zugabe von 1 μM Chemerin-9 inkubiert. Bei den Medium-Kontrollen ohne Zusatz von Chemerin-9, die für jedes Replikat mit der entsprechenden Glukosekonzentration des Mediums mitgeführt wurde, handelt es sich um dieselben Proben wie in Abbildung 6. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse, welche für eine vergleichbare Darstellung nach dem unter Methoden aufgeführten Vorgehen normiert worden sind. Dabei wird die Glukagonproduktion der als Kontrolle fungierenden, unbehandelten Zellen als 100 % angesehen und die davon abweichende Glukagonkonzentration der behandelten Proben in Prozent aufgeführt. Hier lässt sich ablesen, dass die INR-Zellen unter Behandlung mit Chemerin in *low* Glucose Medium ihre Produktion von Glukagon signifikant einschränken, während unter mittleren und hohen Glukosekonzentrationen kein Einfluss von Chemerin auf die Produktion von Glukagon zu beobachten ist.

6.1.5 Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin und Forskolin

Die Stimulierbarkeit der INR-Zellen wurde nun unter weiteren Bedingungen getestet. Nach einer 20-minütigen Vorinkubation wurden die Zellen erneut eine Stunde inkubiert. Neben einem direkten Vergleich zwischen einer Behandlung mit Chemerin-9 (im weiteren Chemerin genannt) und einer Behandlung mit Forskolin sollte auch überprüft werden, ob eine Vorinkubation in Chemerin Auswirkungen und eine anschließende Inkubation in Forskolin einen Einfluss auf die Glukagonsekretion zeigt. Es wurden drei unabhängige Experimente mit einer Glukosekonzentration von 11,1 mM (Standard RPMI 1640) im Zellmedium durchgeführt; zwei mit je sechs Replikaten und eins mit drei Replikaten. Nach einer 20-minütigen Vorinkubation wurden die Zellen eine weitere Stunde inkubiert. Abbildung 9 zeigt die verschiedenen Konditionen und die dazugehörigen Ergebnisse. Chemerin wurde in einer Konzentration von 1 μM verwendet, Forskolin nach EC_{50} (0,06 μM). Eine Medium-Kontrolle (A) wurde mitgeführt. Zusätzlich gibt es eine Probe ohne Vorinkubation bei gleichzeitiger Inkubation mit Chemerin und Forskolin (E).

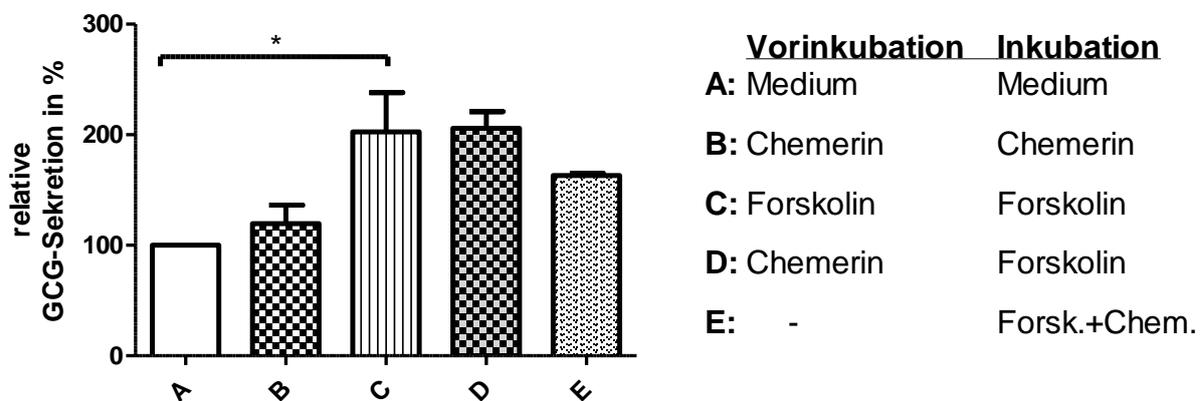


Abbildung 9: INR-Zellen im Sekretions-Assay mit Vorinkubation unterschiedlicher Substanzen. Chemerin-9 1 μM , Forskolin 0,06 μM . Vorinkubation 20 min, Inkubation 60 min. $n = 2-3$, 96 *well*. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus drei unabhängigen Experimenten, mit je 6 Replikaten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. ANOVA (One-way analysis of variance) zur Signifikanzanalyse mit $p < 0,05$ und Tukey's Multiple Comparison Test als Post-Test zur Analyse zwischen Probe und der Kontrolle A. Die nebenstehende Legende erklärt welche Probe mit welcher Substanz während Vorinkubation und Inkubation behandelt wurde. Es zeigt sich eine signifikant höhere relative Sekretion in der mit Forskolin behandelten Gruppe C. Die Gruppe B, mit Chemerin behandelt, wies eine ähnliche relative Glukagonsekretion auf wie die Mediumkontrolle A. Gruppe D zeigt eine ähnliche relative Glukagonsekretion wie Gruppe C, jedoch konnte hier im Vergleich zu Mediumkontrolle keine Signifikanz berechnet werden. Die ohne Vorinkubation 1 h mit Forskolin und Chemerin gleichzeitig inkubierten Zellen der Gruppe E wiesen eine geringere relative Sekretion von Glukagon auf als die Gruppen C und D, und im Vergleich zu Gruppe A und B eine höhere relative Sekretion.

Forskolin alleine stimuliert die Glukagonsekretion der INR-Zellen signifikant (C). Die Behandlung mit Chemerin zeigt keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Dennoch scheint Chemerin einen Einfluss auf die Zellen zu haben, denn die mit Forskolin und Chemerin behandelten Zellen weisen im Gegensatz zur reinen Forskolin-Behandlung keine Signifikanz auf.

6.2 Alpha TC1 (α TC1) Zellen

6.2.1 Basale Glukagonsekretion

6.2.1.1 Analyse der Zellkulturüberstände verschiedener α TC1 Klone

In diesem ersten Verfahren sollen α TC1 Zellen auf ihre Produktivität hin evaluiert werden. Neben der parentalen Zelllinie (α TC1 p.) werden zusätzlich die Klone 6 (α TC1 c6) und 9 (α TC1 c9) untersucht. Es wurde eruiert, ob und wann nach ihrer Aussaat α TC1 Zellen Glukagon produzieren und in wie weit sich die verschiedenen Klone darin unterscheiden. Es wurde ein Experiment mit je zwei Replikaten pro Zeitpunkt durchgeführt, in dem die Zellkulturüberstände der üblichen Kulturplatten mit 10 cm Durchmesser analysiert wurden. Die Konfluenz betrug in allen Kulturplatten 90 %, es wurde das o.g. Standardkulturmedium ohne weitere Zusätze verwendet. Die Entnahme einer Probe aus dem Überstand des Zellkulturmediums erfolgte nach 30, 60, 120, 240, 360 min sowie 24 Stunden nach Aussaat. Die Überstände enthielten im ELISA gut zu detektierende Mengen Glukagon. Die größte Menge Glukagon im Medium konnte generell nach 24h gemessen werden. Besonders hohe Werte zeigten sich hierbei in den Proben der α TC1 p. Zellkulturüberstände (Abbildung 10 und Abbildung 11).

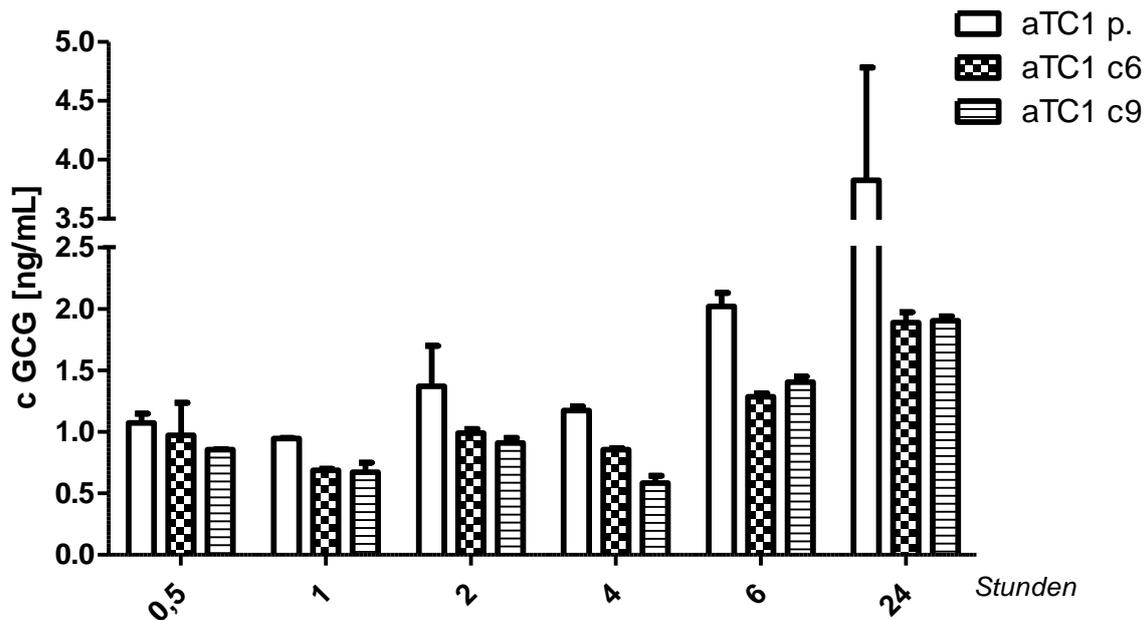


Abbildung 10: Glukagonsekretion unbehandelter α TC1 Zellen in Zellkulturüberständen gruppiert nach Zeit. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Zu allen Messpunkten waren gut zu detektierende Mengen Glukagon im Zellkulturüberstand. Nach 24 Stunden war in allen Proben die größte Menge Glukagon zu messen. Zu den Messpunkten 1 h und 4 h ist für alle Klone ein leichter Abfall der gemessenen Glukagonkonzentration zu verzeichnen. Während die Überstände von α TC1 c9 und c6 stets ähnliche Mengen Glukagon aufwiesen, zeigte sich im Vergleich dazu bei allen Messpunkten eine höhere Glukagonkonzentration in den Überständen der α TC1 p. Zellen.

Ohne Einbezug der Proben nach einer und vier Stunden kann eine kontinuierlich mit der Zeit ansteigende Glukagonkonzentration beschrieben werden. Eine und vier Stunden nach Aussaat der Zellen wurde allerdings in den Mediumüberständen aller α TC1 Klone eine geringere GCG Konzentration gemessen, als zum Zeitpunkt davor. Es scheint sich also zwischen zwei und sechs Stunden nach Mediumwechsel eine Plateauphase zu entwickeln, während dieser die Zellen die Glukagonkonzentration im Medium konstant halten.

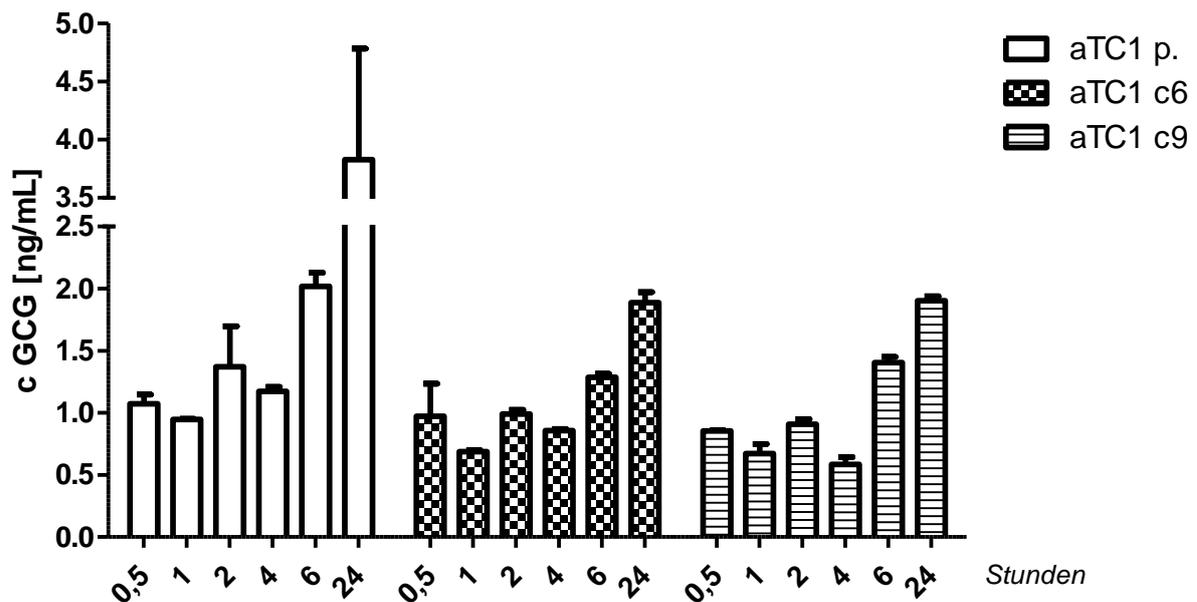


Abbildung 11: Glukagonsekretion unbehandelter α TC1 Zellen in Zellkulturüberständen gruppiert nach Klon. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

6.2.1.2 Analyse der Zellkulturüberstände von α TC1 p.

Da im vorangegangenen Experiment der parentale Klon besonders produktiv war, wurde dieser in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Mediums analysiert. Das Zellkulturmedium (DMEM) ist mit Konzentrationen von 5,6 mM Glukose (*low glucose*) und 25 mM Glukose (*high glucose*) erhältlich. Das Zellkulturmedium (RPMI 1640) hat standardmäßig eine Konzentration von 11,1 mM Glukose. Diese drei üblichen Glukosekonzentrationen wurden in diesem Versuch verglichen. Es wurde ein Experiment mit je zwei Replikaten pro Probe durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in einer 96 *well*-Platte, mit je 12 *wells* pro Glukosekonzentration, ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Inkubator ruhen gelassen. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel (MW) durchgeführt, der als Zeitpunkt Null anzusehen ist. Die Zellkulturüberstände wurden 30, 60, 120, 240, 360 min und 24 h nach MW geerntet, eingefroren und drei Tage nach Aussaat im ELISA analysiert.

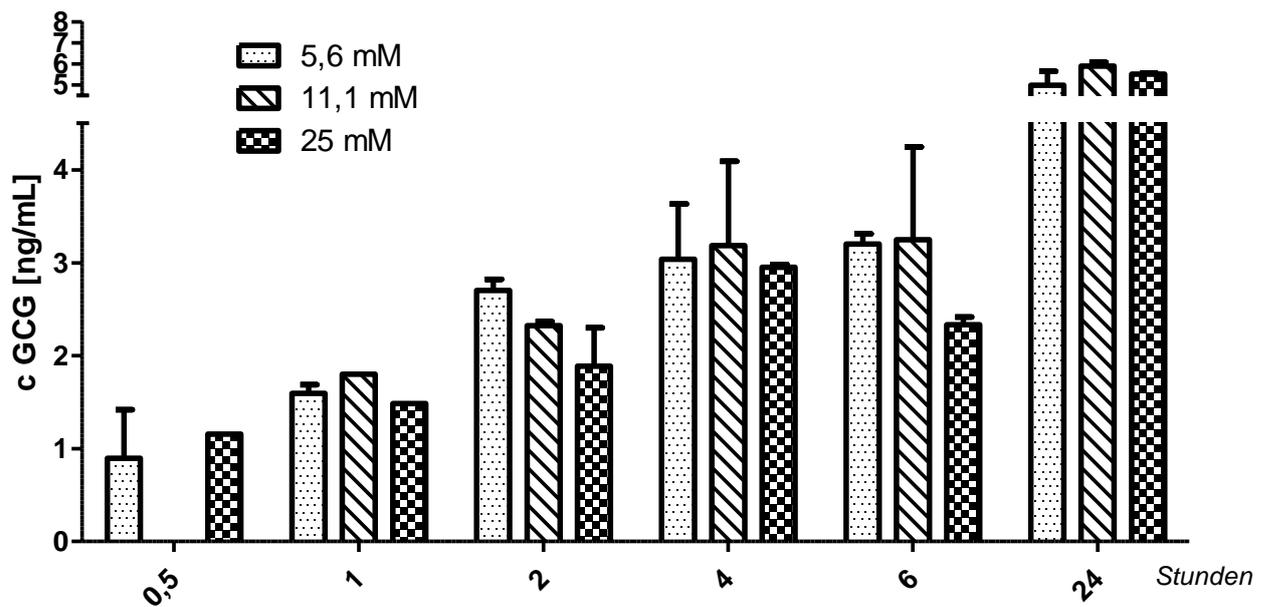


Abbildung 12: α TC1 p. - basale Glukagonsekretion in Abhängigkeit unterschiedlicher Glukosekonzentrationen. Glukosekonzentrationen: 5,6 mM, 11,1 mM und 25 mM im Kulturmedium. Gruppirt nach Zeit. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Es ist im zeitlichen Verlauf ein stetiger Anstieg der Glukagonkonzentration aller Proben zu verzeichnen. In 25 mM Glukose ist die Glukagonkonzentration zu allen Zeitpunkten etwas geringer als in den anderen Glukosekonzentrationen.

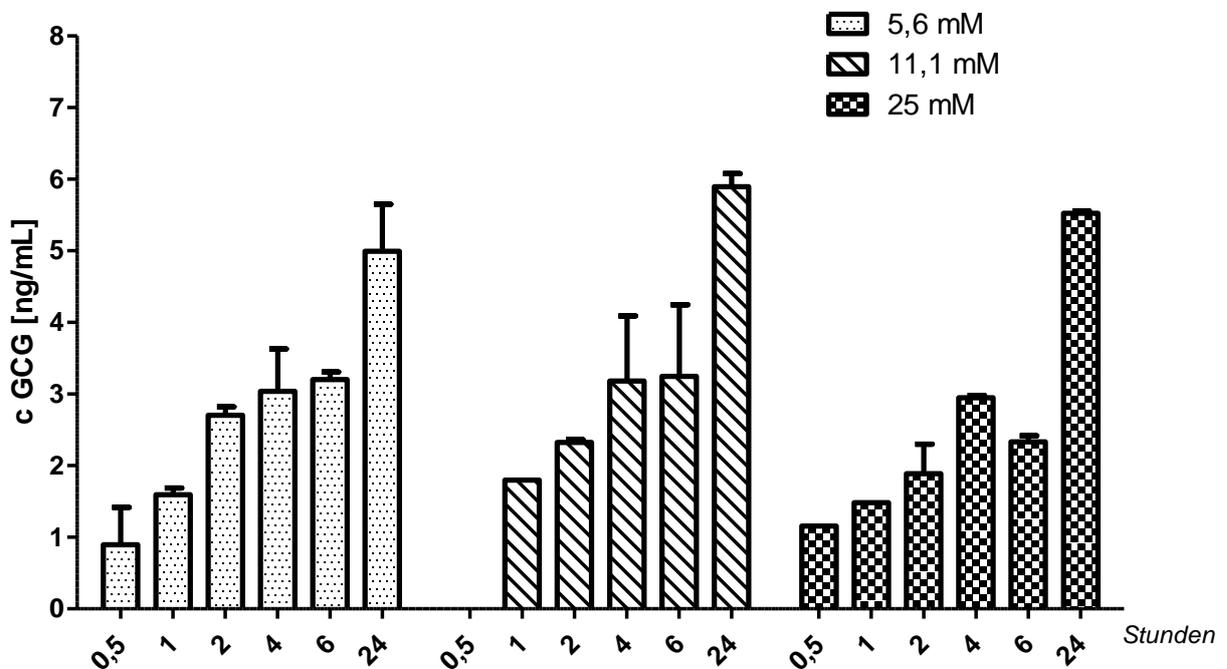


Abbildung 13 α TC1 p. - basale Glukagonsekretion in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Kulturmediums, gruppiert nach Glukosekonzentration. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Die Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen, dass unter allen drei Glukosekonzentrationen die Konzentration von Glukagon im Zellkulturmedium stetig ansteigt, bis sich um einen Zeitpunkt von ca. 240 min nach Mediumwechsel ein Plateau zu entwickeln scheint. Besonders deutlich ist dies unter 11,1 mM Glukose in Abbildung 13 zu erkennen. Die in 25 mM Glukose inkubierten Zellen weisen eine geringere Glukagonproduktion auf. Die Zellen beider Replikate der Probe in 11,1 mM Glukose bei 30 Minuten waren nach der Aussaat nicht konfluent und ausreichend gewachsen, weshalb der Graph an dieser Stelle keinen Wert enthält. Ebenfalls beschädigt war je ein Replikat der Probe 11,1 mM bei 60 Minuten und der Proben in 25 mM bei 30 und 60 Minuten, weshalb der Graph hier keine Fehlerbalken aufweist.

6.2.2 Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin und Forskolin

6.2.2.1 Analyse der Glukagonsekretion verschiedener α TC1 Klone

Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass auch in den Zellkulturüberständen der α TC1 Zellen im ELISA gut zu messende Konzentrationen von Glukagon vorhanden sind. In den drei oben verwendeten α TC1 Klonen sollte anschließend der Einfluss von Chemerin und Forskolin auf die Glukagonsekretion analysiert werden. Die Abbildung 14 zeigt die Klone 9 und 6, sowie den parentalen Klon der α TC1 Zellen im Sekretions-Assay. Pro Klon wurde ein Experiment mit je 2 Replikaten durchgeführt. Die in einer 96 well-Platte ausgesäten Zellen wurden am Folgetag für eine Stunde unter Zusatz von Chemerin und Forskolin inkubiert. Eine Medium-Kontrolle wurde für jeden Klon mitgeführt. Alle hier dargestellten Experimente wurden mit einer Glukosekonzentration von 25 mM im Medium durchgeführt. Da, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, die α TC1 p. Zellen unter einer Konzentration 25 mM Glukose im Medium die geringsten Mengen Glukagon produzierten wurde diese Konzentration für diese Experimente übernommen, um etwaige stimulierende Effekte der verwendeten Substanzen besser sichtbar zu machen. Zur Behandlung wurden verschiedene Konzentrationen von Chemerin (1 und 10 μ M) und Forskolin (10 und 100 μ M) verwendet, um Auswirkungen der Dosis, der verwendeten Substanz, zu untersuchen.

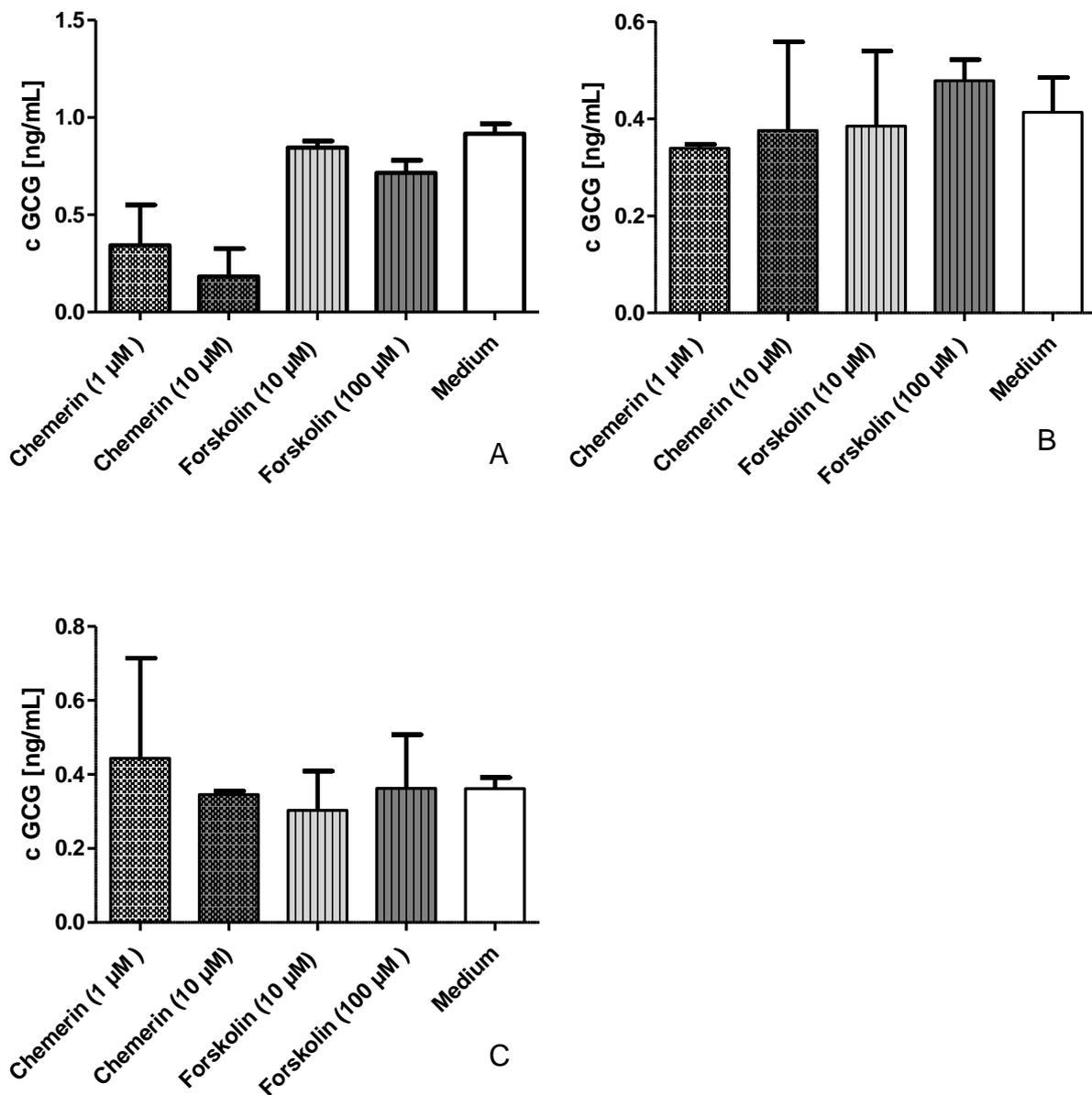


Abbildung 14: Behandlung von α TC1 Klonen mit Chemerin-9 und Forskolin

- A)** α TC1 p - Sekretions-Assay. Behandlung mit Chemerin-9 und Forskolin in unterschiedlichen Dosen (s. Beschriftung). N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Inkubation 1 h, 96 well. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Unter Chemerin-Zusatz sind geringere Glukagonkonzentrationen im Überstand gemessen worden als unter Zugabe von Forskolin. Die Forskolin-Proben weisen mit der Kontrolle vergleichbar hohe Konzentration von Glukagon im Überstand auf. Unter Zugabe von 10 μM Chemerin ist eine geringere Glukagonkonzentration im Überstand detektiert worden als unter Zugabe von 1 μM Chemerin.
- B)** α TC1 c6 - Sekretions-Assay. Behandlung mit Chemerin und Forskolin in unterschiedlichen Dosen. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Inkubation 1 h, 96 well. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Zu allen Messpunkten sind ähnliche Glukagonkonzentrationen in den Proben nachgewiesen worden.

- C)** α TC1 c9 - Sekretions-Assay. Behandlung mit Chemerin und Forskolin in unterschiedlichen Dosen. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Inkubation 1 h, 96 well. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA. Zu allen Messpunkten sind ähnliche Glukagonkonzentrationen in den Proben nachgewiesen worden.

Der parentale Klon (Abbildung 14 A) scheint ähnlich wie die INR-Zellen unter Chemerin eine Hemmung der Glukagonsekretion zu erfahren, die unter höheren Dosen Chemerin auch stärker ausfällt. Bei den Klonen 6 (Abbildung 14: B) und 9 (Abbildung 14 C) bewirkt die Inkubation mit Chemerin keinen signifikanten Einfluss auf die Glukagonsekretion. Eine Stimulation der Glukagonsekretion durch Forskolin, wie zu vor bei den INR-Zellen, scheint bei keinem der α TC1 Klone möglich zu sein.

6.2.2.2 Analyse der Glukagonsekretion von α TC1 p.

Um die in Abbildung 14 dargestellte hemmende Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion des parentalen Klons der α TC1 Zellen zu verifizieren, wurden fünf unabhängige Versuche im gleichen Aufbau und gleichem Normierungsverfahren wie unter 6.1.4 für die INR-Zellen beschrieben, durchgeführt. Hier konnte keine Hemmung der Glukagonsekretion durch Chemerin nachgewiesen werden (Abbildung 15), es zeigte sich jedoch unter 25 mM Glukose im Medium ein signifikanter Anstieg der Glukagonsekretion unter Behandlung mit Chemerin. Unter 5,6 mM Glukose ist ebenfalls eine Stimulation zu sehen, die jedoch auf Grund des höheren Standardmessfehlers im t-Test nicht signifikant ist.

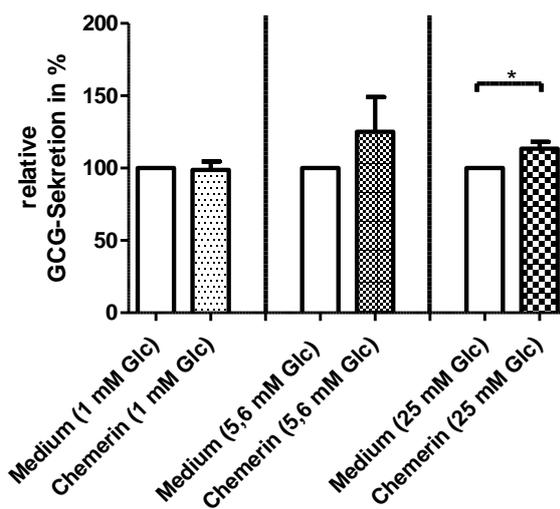


Abbildung 15 Behandlung von α TC1 p. mit Chemerin im Sekretions-Assay. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus fünf unabhängigen Experimenten. T-Test zur Signifikanzanalyse zwischen Probe und der dazugehörigen Kontrolle mit $p < 0,05$ in der Gruppe 25 mM Glc. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Nach der vollständigen Analyse lässt sich also festhalten, dass hier eine mögliche Stimulation der Glukagonsekretion durch Chemerin zu erkennen ist.

6.2.2.3 Analyse der Glukagonsekretion von α TC1 c6

Nachdem eine hemmende Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion des Klons α TC1 p. bestätigt werden konnte sollten nun auch die Funktion der weiteren Klone genauer analysiert werden. Insbesondere sollte untersucht werden, warum die Wirkung von Chemerin auf den parentalen Klon nicht in den anderen Klonen nachzuweisen war. Zwei Gründe sprachen dafür vorerst nur die Zellen α TC1 c6 in die weiteren Versuche aufzunehmen. So zeigte sich der Klon 6 in der Zellkultur leichter zu kultivieren. Im Gegensatz zu Klon 9 zeigte sich ein gleichmäßigeres Wachstum und beim umsetzen oder aussäen der Zellen wurde beobachtet, dass kaum Zellen abstarben, sodass sich schnell und sicher die gewünschte Konfluenz einstellen ließ. Darüber hinaus verdeutlicht Abbildung 14 eine etwas gleichmäßigere Glukagonsekretion des Klon 6 mit geringfügig kleinerer Standardabweichung. An dieser Stelle wurde von der Hypothese ausgegangen, dass bei makroskopisch gleichmäßigem Wachstum und gleichmäßiger Glukagonsekretion, eine Wirkung von Chemerin zwar möglich jedoch aktuell noch nicht sichtbar gemacht worden ist.

Der Klon 6 wurde ebenfalls im Sekretions-Assays untersucht (Abbildung 16). Es wurden hier keine Proben in einer Glukosekonzentration von 1 mM im Medium mitgeführt. Die Werte des Ersten dieser zwei Experimente sind dem in Abbildung 19 aufgeführten Versuch entnommen.

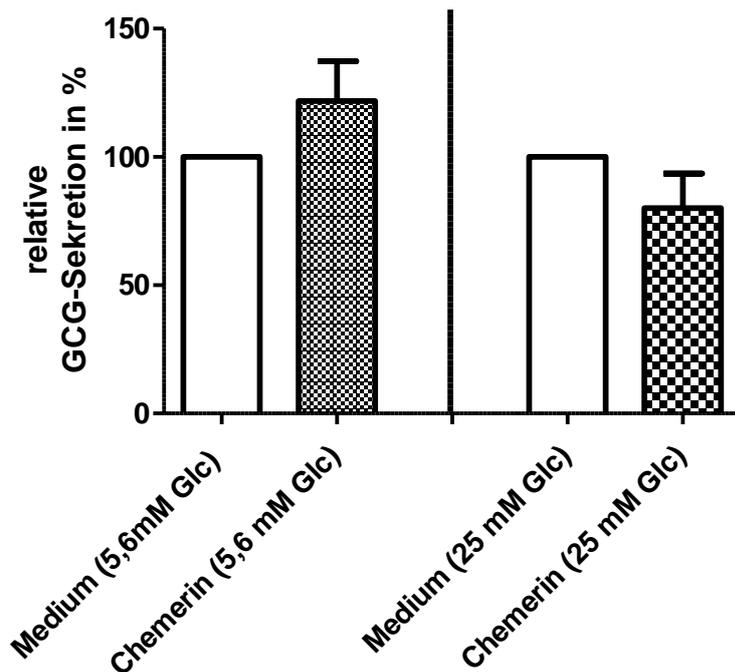


Abbildung 16: Behandlung von α TC1 c6. mit Chemerin im Sekretions-Assay. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Da hier mit $n = 2$ gearbeitet wurde ist eine Signifikanzanalyse der Daten nicht zielführend. Dennoch lässt sich die zu vor schon bei den α TC 1 p Zellen erkannte Mehrproduktion unter der Behandlung mit Chemerin in 5,6 mM Glukose verifizieren. Unter 25 mM Glukose reagiert dieser Klon 6 jedoch mit einer im Vergleich zur Mediumkontrolle geringeren Produktion von Glukagon auf die Behandlung mit Chemerin.

6.2.3 Charakterisierung der α TC1 c6 Zellen

Da die, die einzelnen α TC1 Klone vergleichenden, Versuche eine unzureichende Reaktionsfähigkeit der Klone 6 und 9 vermuten lassen, sollten eben diese Klone genauer untersucht werden, um mögliche Einflüsse auf dessen Funktionsfähigkeit zu eruieren. Da α TC1 c9 im Vergleich zu α TC1 c6 schwerer zu kultivieren ist und sich in der Zellkultur nach wenigen Passagen keine ausreichende Konfluenz nachbilden lässt, wurde die weitere Analyse modellhaft zunächst an α TC1 c6 vorgenommen. Es wurde der Nachweis der Glukagonproduktion von α TC1 c6 mit Hilfe der Immunfluoreszenz verifiziert (Abbildung 17).

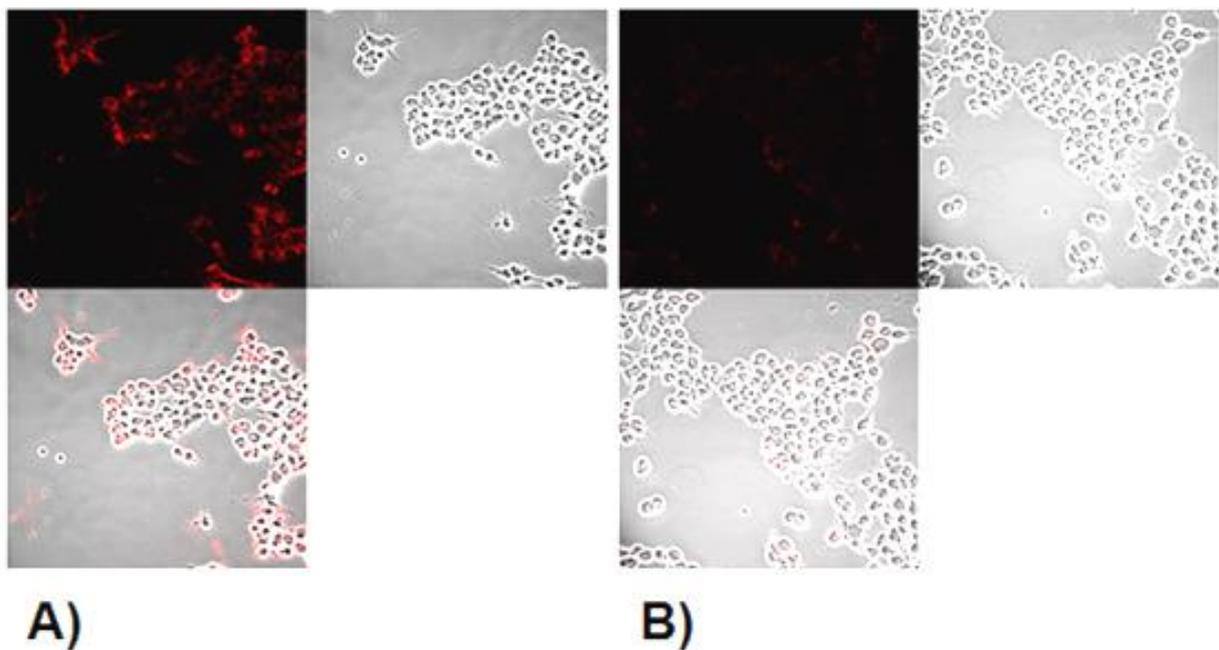


Abbildung 17: Immunfluoreszenz an α TC1 c6 zum Nachweis von Glukagon: A) anti-Glukagon-AK (monoklonal, aus Maus, gegen Glukagon) in einer Verdünnung von 1:2000 auf α TC1 c6, B) negativ Kontrolle (0,1% BSA in PBS statt Primärantikörper), Fixierung: PFA.

Die hier dargestellten Bilder bestätigen die intrazelluläre Expression von Glukagon in den α TC1 c6 Zellen.

Anschließend wurde der Einfluss von, aus der Literatur bekannten, Stimulanzien und Inhibitoren der Glukagonsekretion (Inhibitoren: Somatostatin^{73,80,81}, GLP-1^{73,78} Aktivatoren: Forskolin,^{78,79,82} GIP,⁷⁸ L-Arginin,^{81,82} KCL,⁸¹ Grehlin^{73,83} und PMA^{78,82} auf α TC1 c6 getestet. Hier soll das generelle Verhalten dieses Klons in Bezug auf Substanzen mit bekannter Wirkung nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Experiment mit 6 Replikaten pro Probe durchgeführt. Die auf einer 96-well-Platte ausgesäten Zellen wurden eine Stunde unter Zusatz der in Abbildung 18 aufgeführten Substanzen inkubiert. Neben einer unbehandelten Medium-Kontrolle wurde Ethanol als bekanntes Toxin als Kontrolle mitgeführt. Das Experiment wurde mit einer Glukosekonzentration von 25 mM im Zellkulturmedium durchgeführt. Es ließ sich jedoch durch keine der aufgetragenen Substanzen eine signifikante Wirkung auf die Glukagonsekretion der Zellen nachweisen (Abbildung 18).

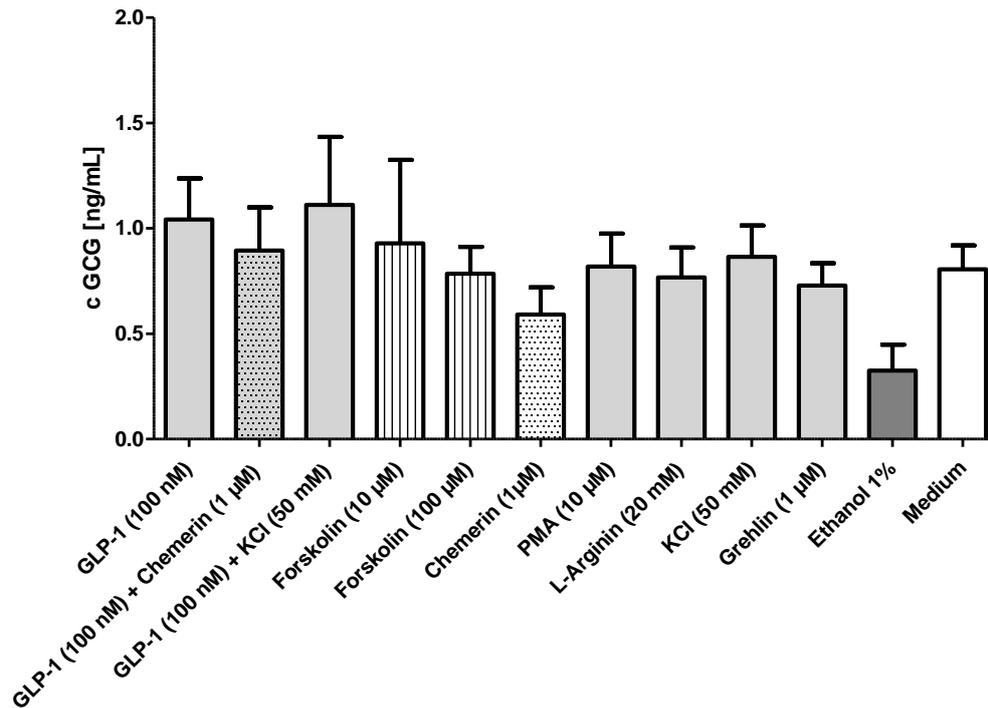


Abbildung 18: α TC1 c6 im Sekretions-Assay mit bekannten Inhibitoren und Stimulantien. N = 1 mit sechs Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Medium enthält 25 mM Glukose. 96 well, Inkubation 1 Stunde. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Allerdings zeigte sich eine geringere Glukagonsekretion der mit GLP-1 und Chemerin in Kombination behandelten Zellen als bei den nur mit GLP-1 behandelten Proben. Dieser Sachverhalt wird im letzten Versuch dieser Reihe (vgl. Abbildung 21 bis Abbildung 24) erneut aufgegriffen und speziell untersucht. Zellen, die nur mit Chemerin behandelt wurden wiesen nach jenen, welche mit Ethanol behandelt wurden, die geringsten Konzentrationen von Glukagon im Medium auf.

Darüber hinaus könnte die well-Größe, der im Experiment verwendeten Zellkulturplatte einen Einfluss auf die bisher schwer zu kontrollierende Glukagonsekretion von α TC1 c6 haben. Die Menge von Zell-Zell-Kontakten oder die Handhabung des Mediumwechsels könnte in einer 96 well-Platte andere Auswirkungen haben, als in einer 24 well-Platte. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen wurde ein Experiment mit sechs Replikaten je Kondition in 96 well und drei Replikaten je Kondition in 24 well durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM Zellkulturmedium mit einer Glukosekonzentration von 25 mM ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde ein

Mediumwechsel zum Auftragen der in Abbildung 19 genannten Glukosekonzentrationen durchgeführt und eine Stunde inkubiert.

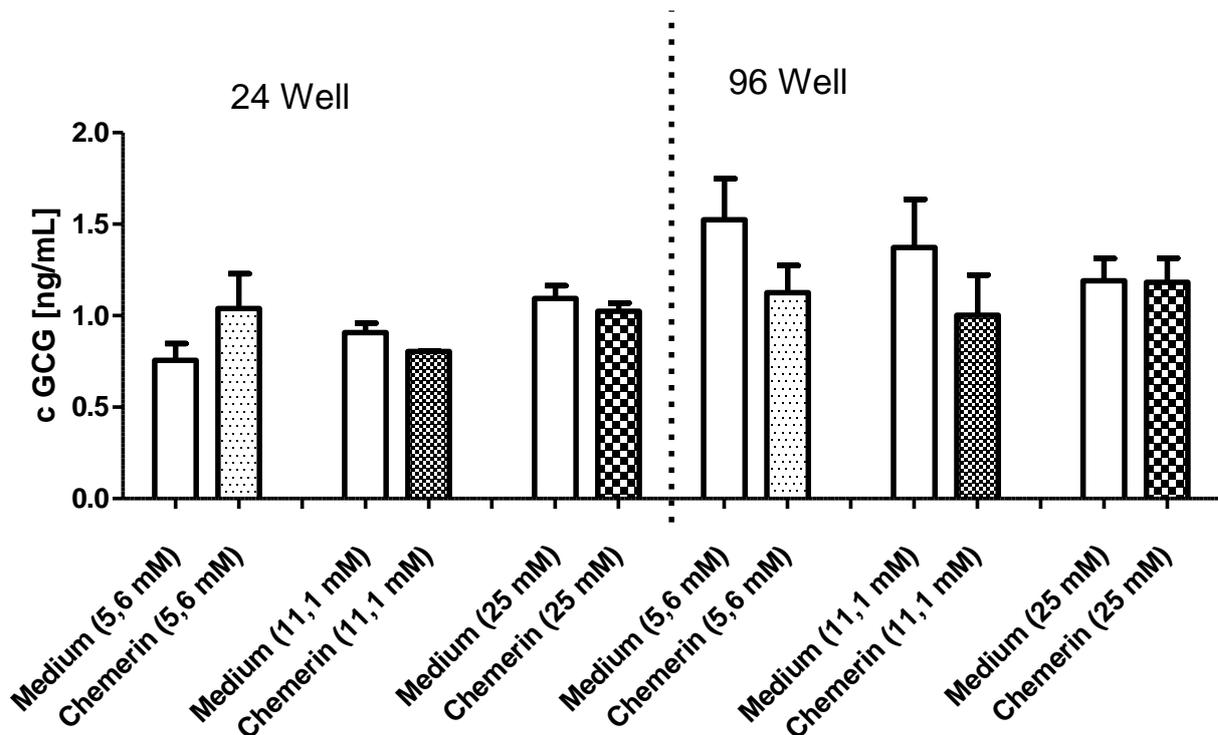


Abbildung 19: α TC1 c6 - Test auf geeignete *well*-Größe der im Experiment verwendeten Zellkulturplatte. Vergleich zwischen 24 *well* (links) und 96 *well* (rechts). Die während der Inkubation im Zellkulturmedium verwendete Glukosekonzentration ist in Klammern angegeben. N = 1 mit sechs Replikaten pro Messpunkt. 1 h Inkubation Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Wie vermutet zeigen sich je nach *well*-Größe unterschiedliche Ergebnisse. So scheint Chemerin in der 24 *well*-Platte die Glukagonsekretion unter einer Glukosekonzentration von 5,6 mM im Medium zu steigern während in der 96 *well*-Platte (außer bei 25 mM Glukose im Medium) ein hemmender Effekt zu abzulesen ist, der mit den geringen Glukagonkonzentrationen im Medium der mit Chemerin behandelten Zellen des vorher gezeigten Versuchs (s. Abbildung 18) vergleichbar ist. Im Mittel aller Replikate der Medium-Kontrolle wurden in der 96 *well*-Platte mit 1,4 ng/ml Glukagon höhere Glukagonkonzentrationen gemessen, als in der 24 *well*-Platte (0,9 ng/ml). Ein signifikanter Einfluss der Glukosekonzentration im Medium lässt sich auch hier nicht nachweisen.

Abschließend wurden zwei unabhängige Experimente mit drei Replikaten je Kondition, im selben Verfahren wie in Abbildung 16 schon gezeigt, durchgeführt, wobei allerdings

drei Stunden inkubiert wurde. Hier soll eruiert werden, ob eine Reaktion der α TC1 c6 Zellen erst nach längerer Inkubation sichtbar wird, da zu vermuten ist, dass in der unter 6.2.1.1 beschriebenen Plateauphase eine Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion besser zu erkennen sein könnte. Abbildung 20 zeigt die normierten Mittelwerte beider Versuche.

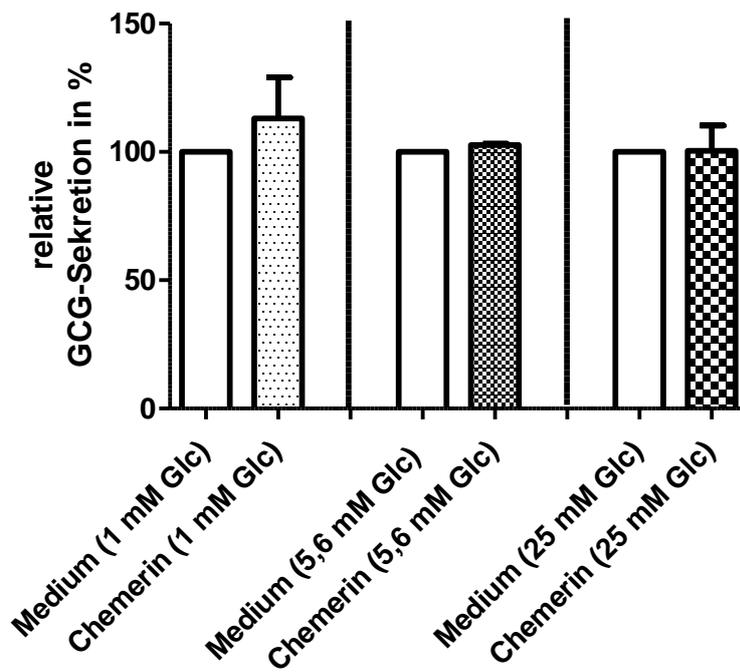


Abbildung 20: Behandlung von α TC1 c6. mit Chemerin im Sekretions-Assay. 3 h Inkubation. Mittelwerte mit Standardmessfehler aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Es wird deutlich, dass auch nach einer dreistündigen Inkubation keine Beeinflussung der Glukagonsekretion durch Chemerin unter diesem Vorgehen sichtbar herbeizuführen ist. Die behandelten Zellen unterscheiden sich in ihrer Sekretion nicht wesentlich von den unbehandelten Kontrollen.

Der letzte Versuch dieser Reihe mit den α TC1 c6 Zellen widmete sich der Frage, ob es möglich ist, durch einen bekannten Inhibitor (GLP-1) eine Wirkung von Chemerin sichtbar zu machen, die zuvor nicht dargestellt werden konnte, da die verwendeten Zellen ggf. überproduktiv sind und sich so nicht ausreichend durch Chemerin beeinflussen lassen. Es wurde zunächst ein Experiment im 96 *well*-Format mit je zwei Replikaten pro Kondition durchgeführt (außer Zeitpunkt Null und 10, hier nur 1

Ergebnisse

Replikate), welches auf Grund seines unerwarteten Ergebnisses in einem Wiederholungsversuch überprüft wurde. Beide Experimente wurden mit einer Glukosekonzentration von 25 mM im Zellkulturmedium durchgeführt. Abbildung 21 verdeutlicht den zeitlich abhängigen Sekretionsverlauf des ersten Experiments.

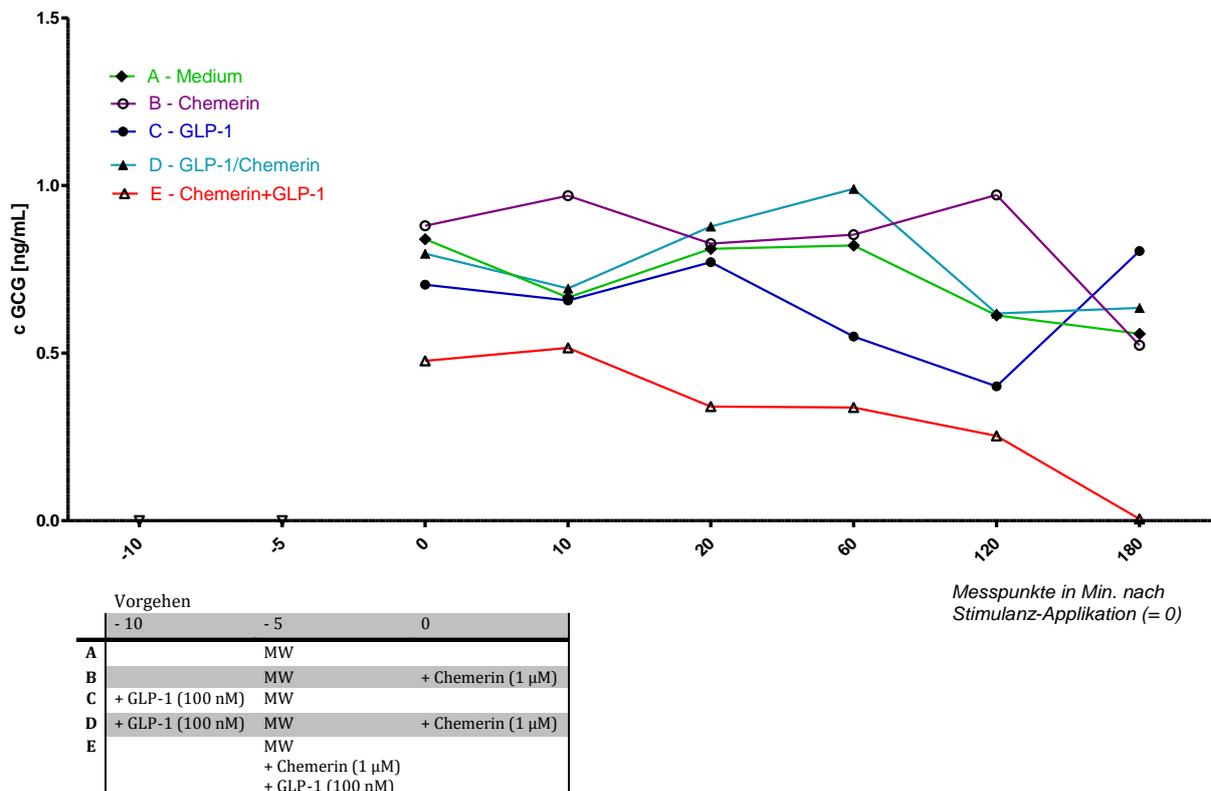


Abbildung 21: Zeitliche Darstellung des Vorgehens bei der kombinierten Behandlung von α TC1 c6 mit Chemerin und GLP-1 (Versuch 1). N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. (Standardmessfehler s. Abbildung 22)

Insgesamt gab es sechs verschiedenen Konditionen im ersten Versuch, die in der Legende (Tabelle) zu Abbildung 21 aufgelistet sind. A stellt dabei eine unbehandelte Mediumkontrolle dar. Da zum Auftragen der Behandlungsdosis von Kondition E ein Mediumwechsel (MW) nötig war, wurde zum Zeitpunkt -5 bei allen Proben das Medium ausgetauscht, damit alle Zellen denselben Bedingungen ausgesetzt waren. Die Zellen der Proben C und D wurden mit GLP-1 vorinkubiert. Da laut De Marinis *et al.* die Wirkung von GLP-1 in α Zellen nach etwa 10 min eintritt, wurde diese Zeitspanne gewählt. Die erste Entnahme von Medium zur Analyse der Glukagonkonzentration erfolgte zum Zeitpunkt Null direkt nach der Zugabe von Chemerin.

Abbildung 22: Behandlung von α TC1 c6 (Versuch 1) mit Chemerin und GLP-1. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Dargestellt sind die Zeitpunkte 20, 60, 120 und 180 min. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Abbildung 22 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Glukagonkonzentrationen der einzelnen Konditionen von Messpunkt 20 min bis 180 min.

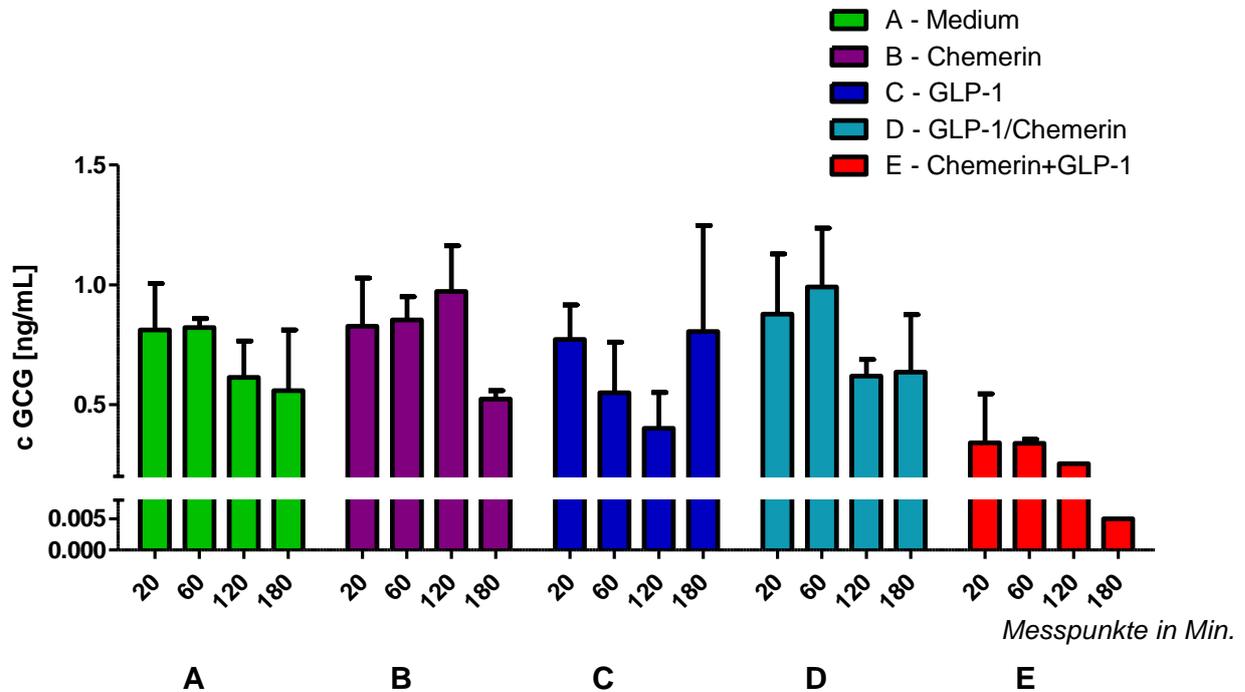


Abbildung 22: Behandlung von α TC1 c6 (Versuch 1) mit Chemerin und GLP-1. N = 1 mit zwei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Dargestellt sind die Zeitpunkte 20, 60, 120 und 180 min. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

In diesem Versuch war erst nach 120 min (A, C, D) die Tendenz abzulesen, dass die Glukagonsekretion der Zellen nachlässt. Somit ist anzunehmen, dass GLP-1 die hier verwendeten Zellen erst nach etwa 120 min sichtbar beeinflusst. Des Weiteren ist unter der Behandlung mit Chemerin und GLP-1 gleichzeitig (E) ein kontinuierliches Abnehmen der Glukagonkonzentration im Zellmedium festzustellen, während die Zellen unter allen anderen Konditionen Glukagon ohne erkennbare Konstanz sezernieren. Um diesen auffälligen Befund zu verifizieren wurde ein Wiederholungsversuch durchgeführt. Hier wurde ein vereinfachtes Verfahren verwendet. Die Zellen wurden erneut in einer 96 well-Platte ausgesät, diesmal mit drei Replikaten pro Kondition. Auf die Vorinkubation am nächsten Tag (und somit Kondition D) wurde jedoch verzichtet. Es wurde ein MW in allen wells vorgenommen, wobei direkt mit der Behandlung begonnen wurde. Unterschieden wurde zwischen einer unbehandelten Mediumkontrolle (A), einer

Ergebnisse

Behandlung mit Chemerin (B), einer Behandlung mit GLP-1 (C) und der gleichzeitigen Behandlung mit Chemerin und GLP-1 (E). Als Messzeitpunkte wurden 30, 60, 120 und 180 Minuten nach MW gewählt. Abbildung 23 fasst die Mittelwerte der gemessenen Glukagonkonzentrationen zusammen.

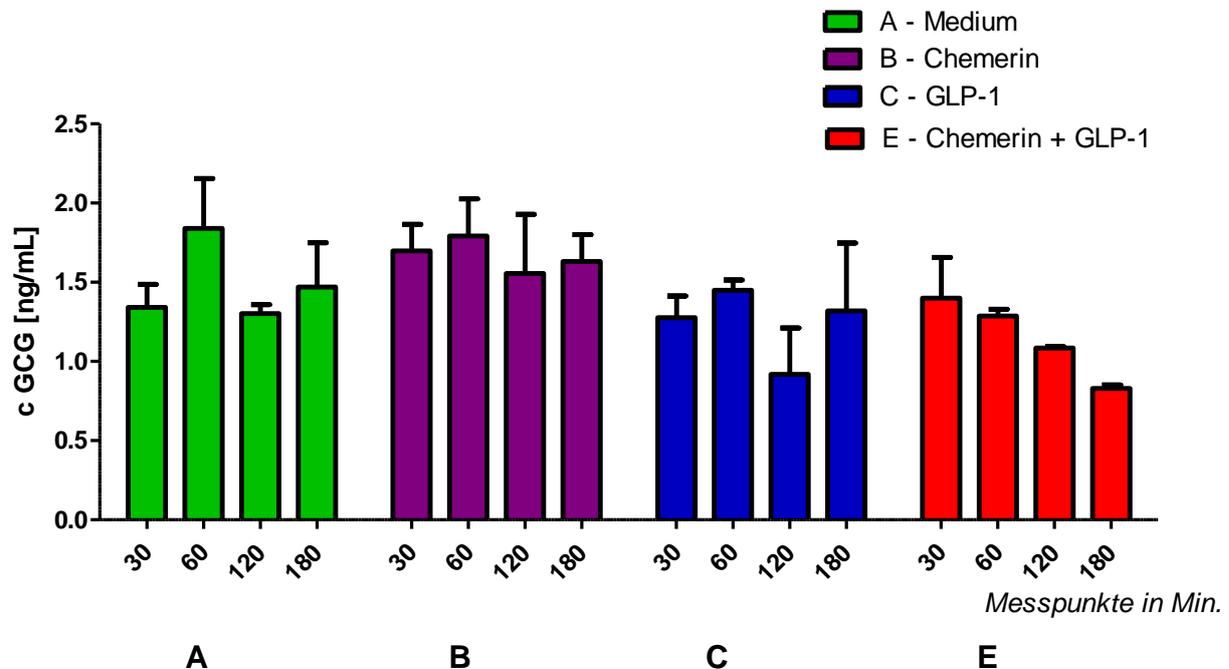


Abbildung 23: Behandlung von α TC1 c6 (Versuch 2) mit Chemerin und GLP-1. N = 1 mit drei Replikaten pro Messpunkt. Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Analytik erfolgte mittels Glukagon-ELISA.

Die im Vergleich zu den anderen Konditionen kontinuierlich sinkende Glukagonsekretion der Behandlungsgruppe E ist erneut eindeutig auszumachen und bestätigt sich somit nach diesem zweiten Versuch. Mit dem Hinweis, dass durch die Vorinkubation im ersten Versuch die Messzeitpunkte in Versuch 2 je nach Kondition (C und E) 5 bis 10 Minuten von denen in Versuch 1 abweichen (z.B. Kondition C: 60 min in Versuch 2 entspräche 50 min in Versuch 1 oder Kondition E: 60 min in Versuch 2 entsprechen 55 min in Versuch 1) lassen sich bei Versuche durchaus zusammenfassen, was in Abbildung 24 dargestellt ist. In Versuch 1 wurden generell geringere Glukagonkonzentrationen (Mittel aller Replikate: 0,59 ng/ml) gemessen, als in Versuch zwei (Mittel aller Replikate: 1,39 ng/ml), was die hohen Standardabweichungen in der Zusammenfassung erklärt.

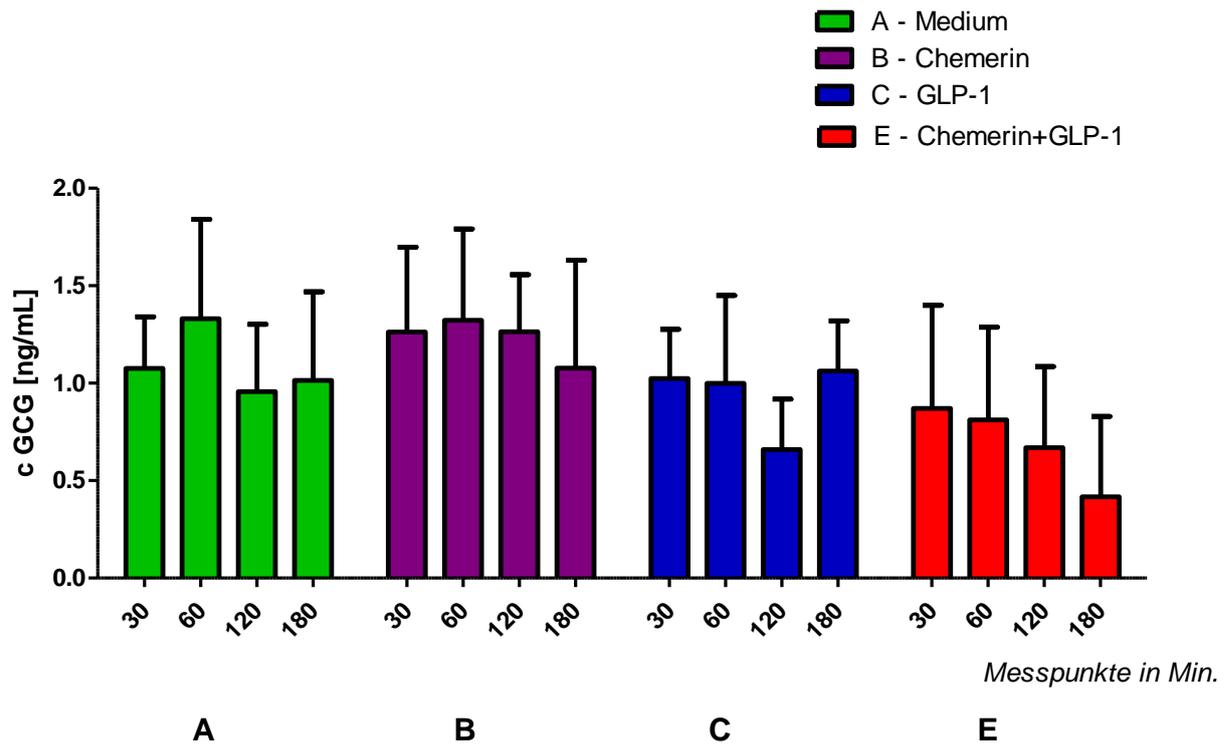


Abbildung 24: Mittelwerte mit Standardmessfehler der Versuche 1 und 2 (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23).

6.3 Nachweis von Chemerin-Rezeptoren oder ihrer mRNA in unterschiedlichen Zelllinien durch Immunfluoreszenz, WB und qPCR

6.3.1 Antikörper-Validierung in transfizierten HEK-Zellen (mCMKLR1)

Um eine sichere Positiv-Kontrolle für Expressions-, Bindungs- oder Funktions-Assays gewährleisten zu können, empfiehlt es sich eine Zelllinie künstlich per Transfektion einer cDNA mit dem gesuchten Protein auszustatten. Hierzu wurden HEK-Zellen mit mCMKLR1 transient transfiziert. Es ist bekannt, dass der Rezeptor membranständig lokalisiert ist. Der hier verwendete Antikörper der Firma Lifespan ist ein anti-mCMKLR1 Antikörper und heißt BZ 194. Abbildung 25 zeigt den randständigen Rezeptor in den transfizierten HEK Klonen unter dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss (Oberkochen, DE)).

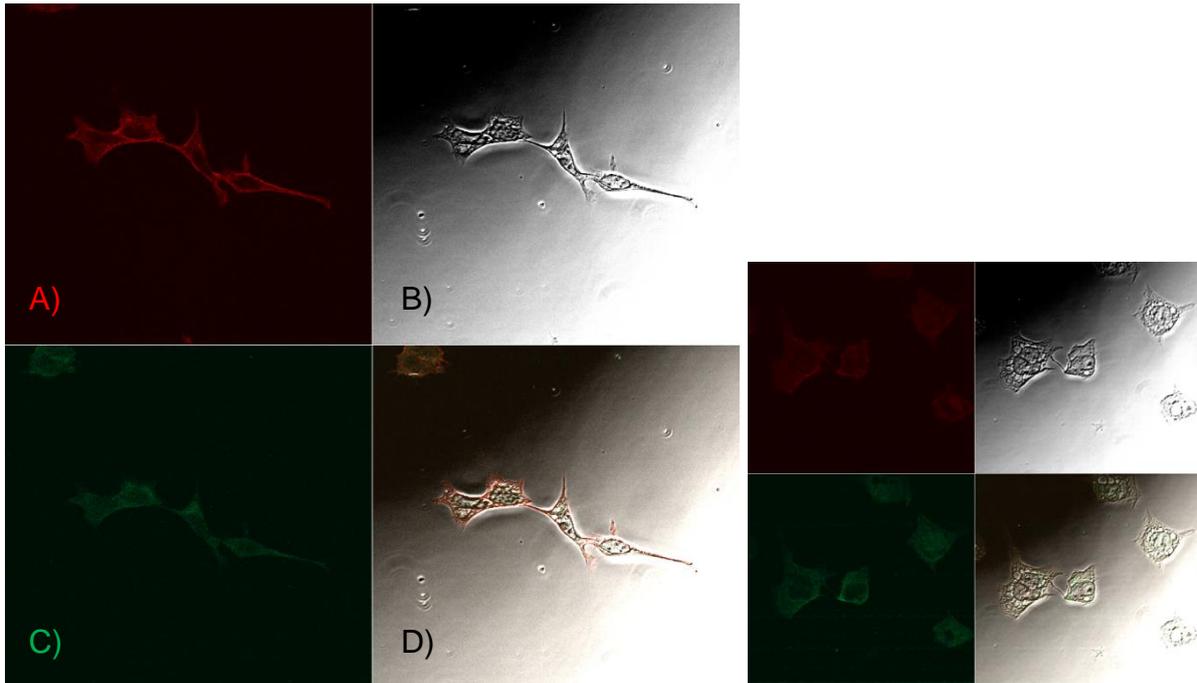


Abbildung 25 Nachweis von mCMKLR1 in transfizierten Zellen. Die Zellen wurden mit mCMKLR1-myc-cDNA transfiziert, Zelllinie: HEK Klon D1. Primär-AK: Anti-mCMKLR1 „BZ194“, Verdünnung: 1:25 (3,6 µg/mL) und Anti-c-myc-Tag 9E10, Verdünnung 1:500. Sekundär-AK: GaRat-Cy2, Verdünnung 1:200 und GaM-Cy3, Verdünnung 1:1000. Links: A) Nachweis myc-Tag: Anti-c-myc-Tag 9E10 + GaM-Cy3 (rot), B) Zelle (farblos), C) Nachweis CMKLR1: BZ194 + GaRAT-Cy2 (grün), D) Nachweis der Co-Lokalisation: Match von A) und C). Rechts: Negativ Kontrolle.

6.3.2 Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz

Nach Validierung der Anwendbarkeit von BZ 194 wurden verschiedene murine Zelllinien, unter anderem auch eine Zelllinie aus der Ratte (RBL), in der Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein des mCMKLR1 untersucht. Alle im Folgenden dargestellten Immunfluoreszenzen wurden wie unter Methoden (Kap. 5.7) beschrieben durchgeführt. Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch aufgeführt. Ein Häkchen symbolisiert eine korrekte negativ-Kontrolle, die Pluszeichen geben die Intensität des Signals unter dem Elektronenmikroskop an (+ Signal vorhanden, ++ deutliches Signal, +++ sehr deutliches Signal). Ein Minuszeichen steht für kein vorhandenes Signal.

Zelllinie	PFA			Methanol/ Aceton		
	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle	Anti-mCMKLR1	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle	Anti-mCMKLR1
α TC1 p.	✓		++	✓	+++	+
α TC1 c9	✓	+++	-	✓	++	+
α TC1 c6	✓	+	-	✓	+	-
RBL	✓	++	-	✓	++	+
P3X63Ag8	✓	+++	-	✓	+	++

Tabelle 2 - Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz. Obwohl α TC1 c6 in der Funktionsanalyse die besten Resultate lieferte, gelang der Rezeptornachweis hier nicht. Die Klone p. und c9 zeigten in der Methanol/Aceton-Fixierung ein geringes Signal für den Rezeptor. Negativ-, wie auch positiv-Kontrolle bestätigten stets eine korrekte Durchführung der Analyse, lediglich in der PFA-Fixierung gelang bei α TC1 p. die Positivkontrolle nicht, es zeigten sich hier keine Zellen auf dem Objektträger.

In diesem ersten Versuch wurde auch getestet ob es wichtige Unterschiede durch die Fixierungsmethode gibt (PFA vs. Methanol/Aceton). Hier zeigte sich vor allem eine bessere Praktikabilität der PFA-Fixierung im Vergleich zu Methanol/Aceton. Zusätzlich präsentierte sich das vorhandene Signal bei α TC1 p. deutlicher, während die anderen Zellen eindeutig kein Signal aufwiesen. Die Methanol/Aceton-Fixierung zeigte geringfügig unschärfere Signale. Insbesondere die Positivkontrollen zeigten unter PFA-Fixierung klarere Signale.

Anschließend wurde der Versuch für die in der Funktionsanalyse relevante Zelllinien wiederholt. Auch die INR-Zellen wurden, obwohl aus dem Hamster stammend, mit den vorliegenden Antikörpern getestet. Da auch bei den RBL-Zellen (Ratte) gute Resultate vorlagen, wurde angenommen, dass die Antikörper ebenso in Hamsterzelllinien detektieren können. Die Wiederholung erfolgte auf Grund der o.g. Beobachtungen nur mit PFA-Fixierung. Zur Qualitätssicherung wurde auch einen positiv-Kontrolle von transfizierten HEK-Klonen mitgeführt. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Beobachtungen unter dem Elektronenmikroskop.

Ergebnisse

Zelllinie	PFA			
	neg. Kontrolle	pos. Kontrolle	Anti-mCMKLR1	neg. Kontrolle für KI67
INR	✓	++	++	
α TC1 p.	✓	++	-	
α TC1 c6	✓	+++	-	
α TC1 c9	✓	++	-	
HEK	✓	+++	+++	✓
t. Transf. mit mCMKLR1	Nachweis der Membranständigkeit des Rezeptors Nachweis der guten Transfektion → overlay mit anti-myc-Control			

Tabelle 3 - Nachweis von mCMKLR1 in verschiedene Nagerzelllinien mit BZ194 in der Immunfluoreszenz – Wiederholung für relevante Zellen mit PFA-Fixierung

In den murinen Zelllinien konnte auch hier kein Signal für den mCMKLR1 nachgewiesen werden. Die INR-Zellen präsentierten jedoch ein deutliches Signal, welches mit der Positivkontrolle gut zu vergleichen war. Negativ- wie Positivkontrollen bestätigten wieder die korrekte Durchführung der Analyse, auch die Kontrolle mittels transfizierter HEK-Zellen bestätigte die bereits bekannten Resultate und einen korrekten Experimentablauf.

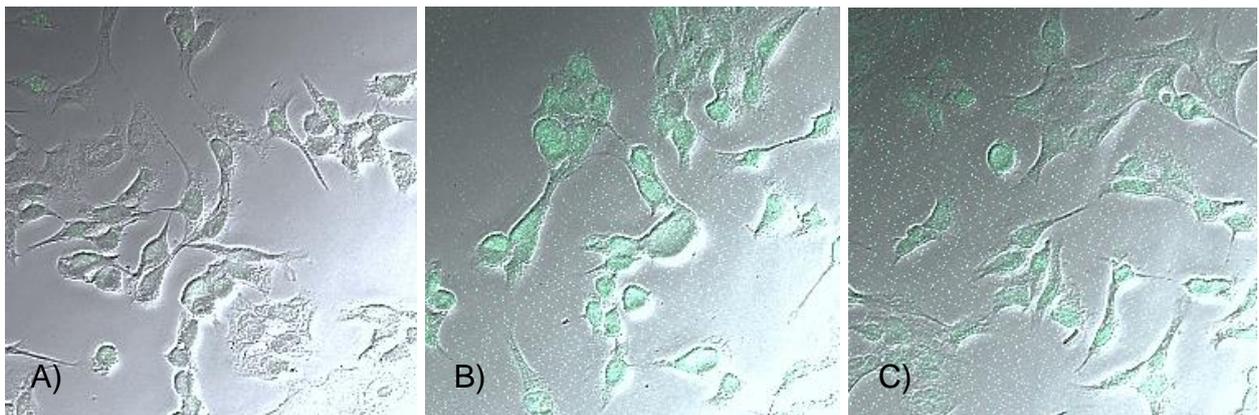


Abbildung 26 Überlagerung von Hellfeld- und Immunfluoreszenz-Mikroskopie von INR-Zellen. Primär-AK: Anti-mCMKLR1 „BZ194“, Verdünnung: 1:10 (Konz.: 20 µg/mL). Sekundär-AK: GaRat-Cy2, Verdünnung 1:100 A) Negativ-Kontrolle, B) positiv-Kontrolle, C) Nachweis von CMKLR1.

Während die Zellen der negativ Kontrolle kein Fluoreszenz-Signal zeigen, repräsentiert die grüne Farbe der Zellen von positiv Kontrolle (B) und Probe (C) die spezifische Aufnahme des Antikörpers an dem vorgesehenen Rezeptor. Im Falle der Probe (C) sieht dies für den Nachweis des CMKLR1 in INR Zellen.

6.4 Rezeptornachweis in humanen Zelllinien (hCMKLR1, hGPR1, hCCRL2)

Wie einleitend erklärt beschreiben Datenbanken das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien. Hier soll nun analysiert werden mit welchen Verfahren und Methoden ein sicherer Nachweis der Proteine gelingt, um dann in eventuell nachfolgenden Experimenten die Rezeptoren der Zelllinien auf ihre Funktionalität hin untersuchen zu können, sei es *in vitro* oder *in vivo*. Abbildung 27 zeigt frei nach Datenbank-Lage 03/2013 (www.GTExPortal.org; www.BioGPS.org) die Genexpression von CMKLR1, CCRL2 und GPR1 in verschiedenen Tumorzelllinien. Je nach Verfügbarkeit wurden die dort aufgelisteten Zelllinien geordnet (vgl. 5.4.1) oder Zellen aus ähnlichen Geweben verwendet um diese auf das Vorhandensein der genannten Rezeptoren und deren mRNA zu analysieren.

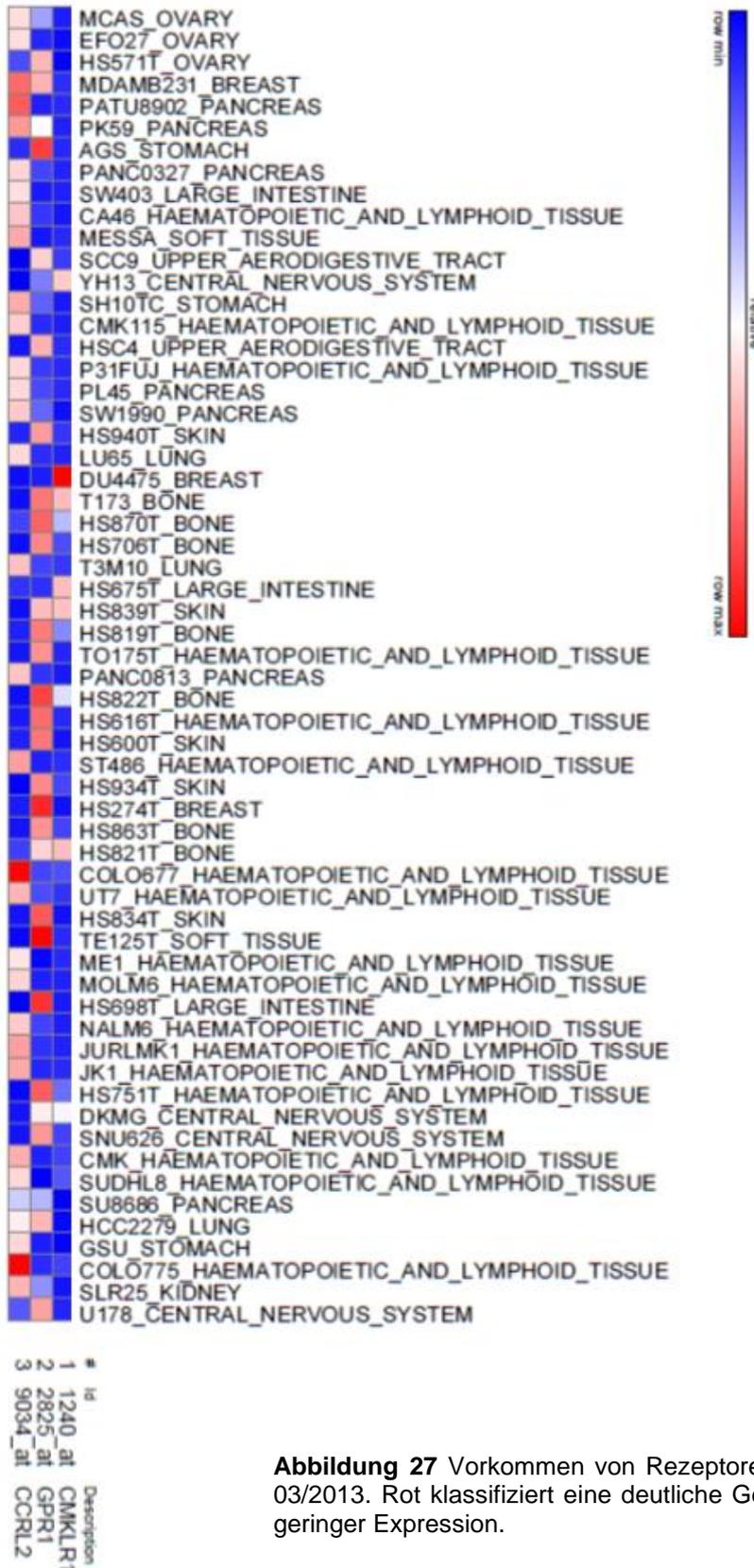


Abbildung 27 Vorkommen von Rezeptoren in Zelllinien nach Datenbanken von 03/2013. Rot klassifiziert eine deutliche Genexpression im Vergleich zu Blau mit geringer Expression.

6.4.1 Nachweis von Rezeptor-mRNA-Molekülen mittels qPCR

6.4.1.1 CMKLR1

Neben den Nagerzelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit auch humane Zelllinien untersucht. Die aus o.g. Literatur bekannten Zellen mit CMKLR1 Nachweis wurden mit Hilfe der qPCR auf das Vorhandensein der Rezeptor-mRNA hin getestet.

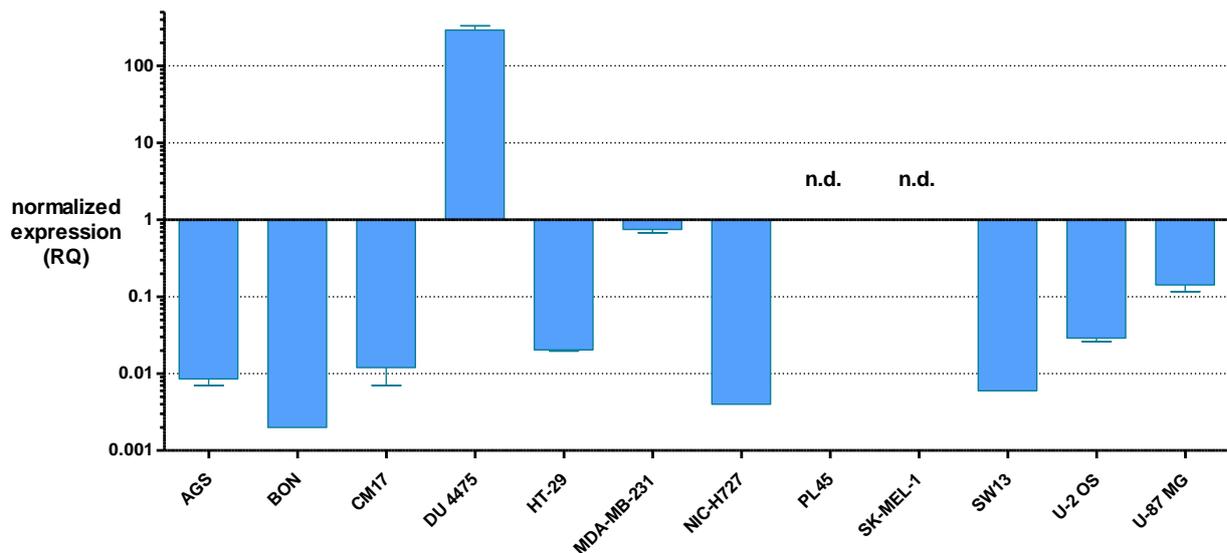


Abbildung 28 Nachweis von CMKLR1-mRNA in humanen Tumorzelllinien. N = 3 für die Zelllinien Du 4475, HT-29, MDA-MB-231 und U-87 MG, für alle anderen Zelllinien N = 2, auf Grund der zum Versuchszeitpunkt verfügbaren Zellen in Kultur. Je drei Replikate, Mittelwerte mit Standardmessfehler, normiert auf Cq 34 in Kombination mit dem ΔC_t -Wert wie unter 5.6.3 erläutert, n.d. = nicht detektiert.

Außer in PL 45 und SK-Mel-1 Zellen konnten in allen Zelllinien geringe Mengen der gesuchten mRNA von CMKLR1 nachgewiesen werden. In den BON und NIC-H727 Zellen konnte die gesuchte mRNA nur in einem der zwei unabhängigen Versuche detektiert werden. Da ein Wert von Null nicht aufgetragen werden kann, stellt sich in dieser Ansicht kein Fehlerbalken dar. Die SW13 Zellen präsentierten beiden unabhängigen Versuchen zweimal den gleichen Messwert, weshalb sich hier ein Standardmessfehler von Null ergibt. Besonders hervorzuheben ist die Zelllinie DU 4475. Im Vergleich zu allen anderen gemessenen Werten, zeigte sich hier die größte Menge mRNA für CMKLR1.

6.4.1.2 CCRL2

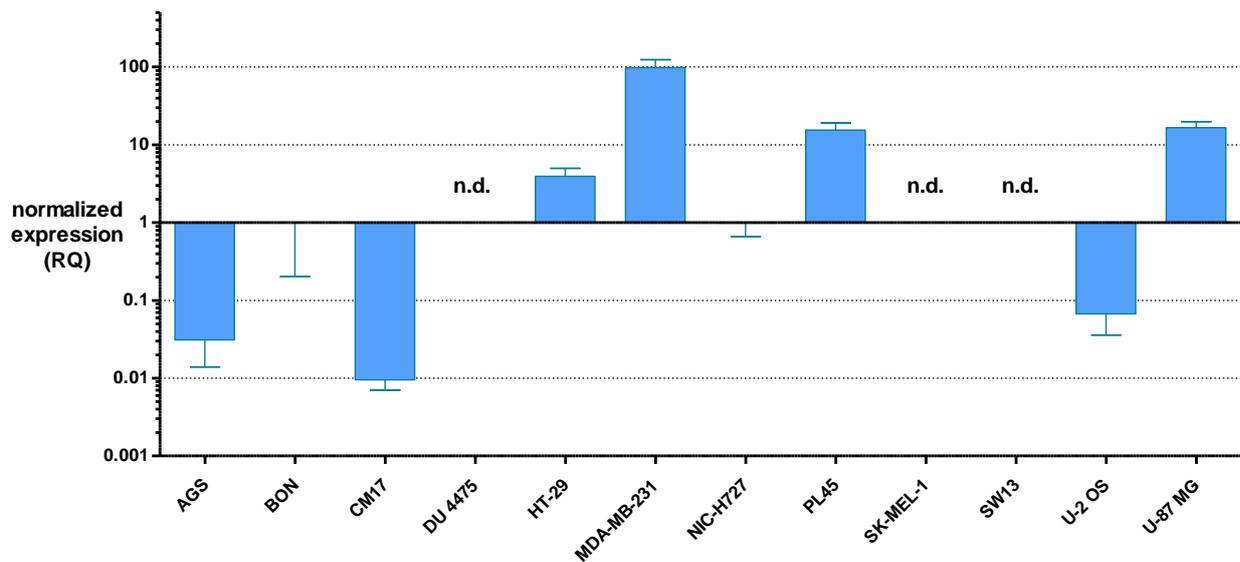


Abbildung 29 Nachweis von CCRL2-mRNA in humanen Tumorzelllinien. N = 3 für die Zelllinien Du 4475, HT-29, MDA-MB-231 und U-87 MG, für alle anderen Zelllinien N = 2, auf Grund der zum Versuchszeitpunkt verfügbaren Zellen in Kultur. Je drei Replikate, Mittelwerte mit Standardmessfehler, normiert auf Cq 34 in Kombination mit dem ΔC_t -Wert wie unter 5.6.3 erläutert, n.d. = nicht detektiert.

Auch hier zeigt sich in vielen der untersuchten Zelllinien die mRNA für CCRL2. In DU 4475 Zellen, wie auch in SK-MEL-1 und SW 13 Zellen konnte die Rezeptor-mRNA nicht detektiert werden. Besonders hohe Werte wurden in MDA-MB-231 Zellen gemessen. Ebenso über dem relativen cut-off von 1 liegen die Zelllinien HT-29, PL45 und U-87 MG.

6.4.1.3 GPR1

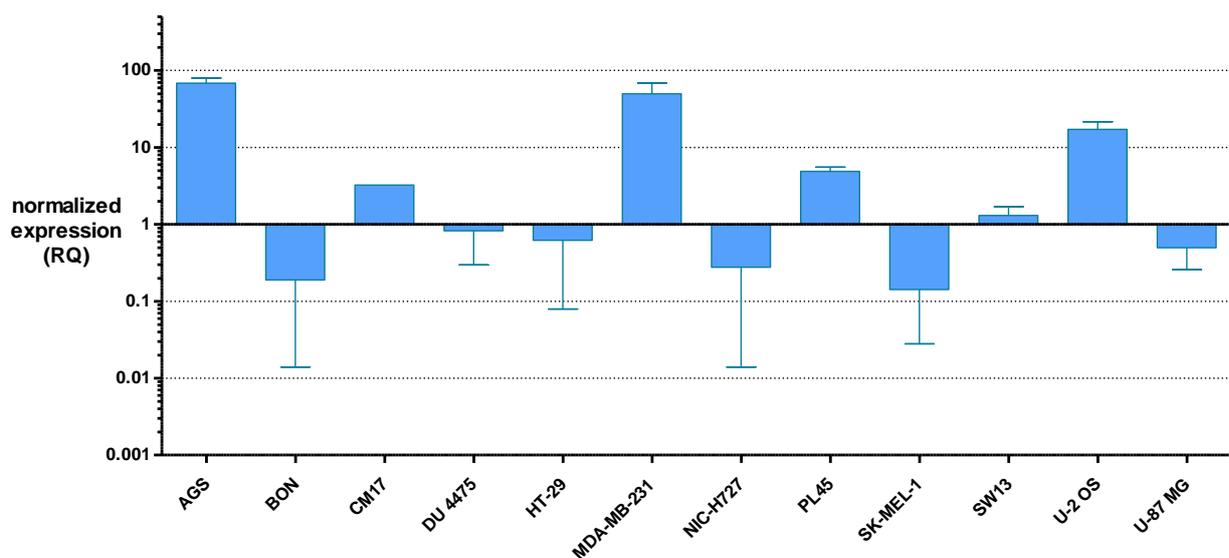


Abbildung 30 Nachweis von GPR1-mRNA in humanen Tumorzelllinien. N = 3 für die Zelllinien HT-29, MDA-MB-231 und U-87 MG, für alle anderen Zelllinien N = 2, auf Grund der zum Versuchszeitpunkt

Ergebnisse

verfügbaren Zellen in Kultur. Je drei Replikate, Mittelwerte mit Standardmessfehler, normiert auf Cq 34 in Kombination mit dem ΔCt -Wert wie unter 5.6.3 erläutert, n.d. = nicht detektiert.

CM17 Zellen zeigen in dieser Darstellung keinen Fehlerbalken, weil die gesuchte mRNA nur in einem der zwei unabhängigen Versuche detektiert werden konnte. Ein Wert von Null kann nicht aufgetragen werden. Die höchste Expression des gesuchten Gens zeigen AGS und MDA-MB-231, auch CM17, PL45 und U-2 OS zeigen RQ-Werte deutlich über dem relativen cut-off von 1. Zusätzlich gruppieren sich DU 4475, SW13 und U-87 MG nahe um diesen Wert. Damit weisen, im Vergleich zu den beiden zuvor präsentierten Rezeptoren, die meisten Zellen eine Genexpression von GPR1 auf.

6.4.2 Validierung der qPCR Ergebnisse im WB

6.4.2.1 CMKLR1

Um die o.g. Ergebnisse in einer zweiten Untersuchungsmethode zu validieren, wurde mit ausgewählten Zelllinien, und nunmehr anderen Antikörpern, ein Western Blot durchgeführt. Die besonders hoch eingeschätzte Expression von CMKLR1 in DU 4475 Zellen konnte bestätigt werden. Die folgende Abbildung 31 präsentiert das Ergebnis, bei dem CMKLR1 bei etwa 42 kDa in der Elektrophorese zu suchen ist.

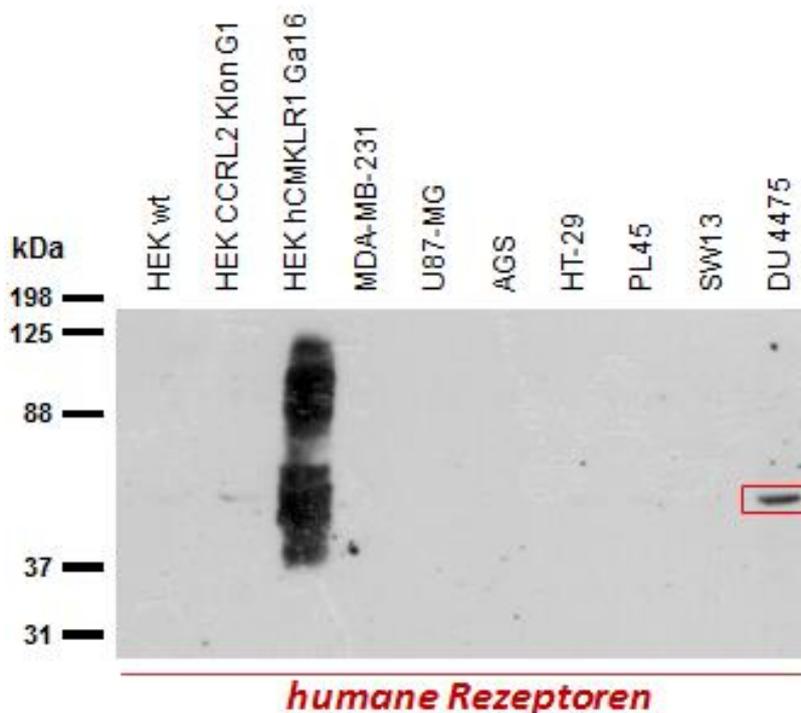


Abbildung 31 WB - CMKLR1-Nachweis in unterschiedlichen Ziellinien. Positiv-Kontrolle: transfizierte HEK, negativ-Kontrolle HEK wt (wildtype). Primär-Antikörper: anti-hCMKLR1 aus Rabbit (Cayman) 1:10.000 (0,1 µg/mL), Sekundär-AK: POD-GaR 1:10.000 - CMKLR1 ca. 42 kDa

6.4.2.2 CCRL2

Ebenso wie für den zuvor beschriebenen Rezeptor CMKLR1 wurden die qPCR Ergebnisse auch für CCRL2 im Western Blot wiederholt. Hier bestätigt sich das negative Signal für CCRL2 in SW13 und DU 4475 Zellen. Die Expression von CCRL2 in MDA-MB-231 Zellen konnte hinreichend bestätigt werden, zeigte sich jedoch nicht so ausgeprägt wie erwartet. HAT-29 und PL45 Zellen präsentieren hingegen ein deutliches Signal, welches die Ergebnisse der qPCR bestätigt. Ein dezentes Signal findet sich auch für die AGS Zellen, dies ist mit den qPCR-Ergebnissen ebenso vereinbar. Für die U-87 MG Zellen unterscheiden sich die Ergebnisse, da hier im Western Blot kein Signal zu erkennen ist. Auffällig ist, dass sich bei ca. 88 kDa ein fast in allen Ziellinien auftretendes Signal sichtbar wird, in den DU 4475 Zellen scheint es bei ca. 125 kDa aufzutreten. Lediglich in den CCRL2-positiven Zelllinien PL45 und HT-29 erscheint ebendieses Signal nicht. Abbildung 32 präsentiert die beschriebenen Ergebnisse.

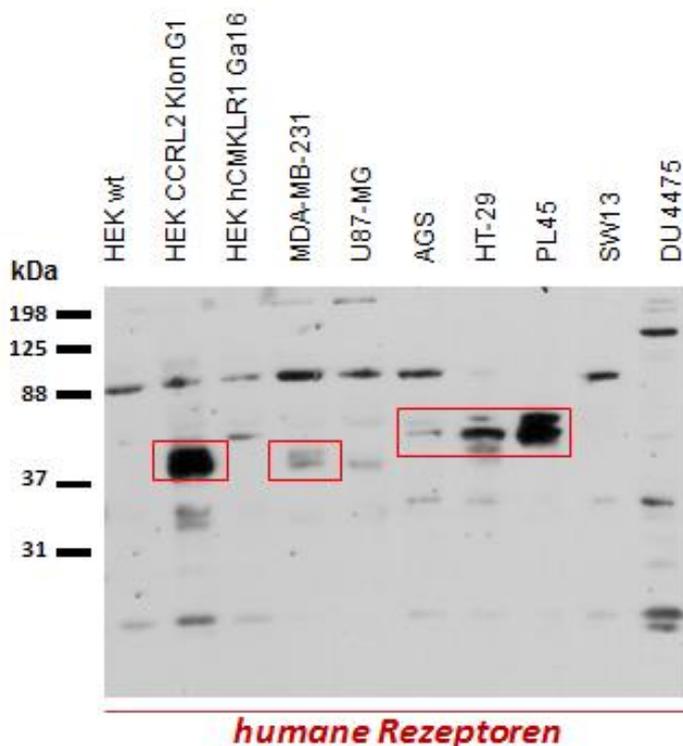


Abbildung 32 WB - CCRL2-Nachweis. Positiv-Kontrolle: transfizierte HEK, Negativ-Kontrolle HEK wt (wildtype). Primär-Antikörper: anti-hCCRL2 aus Rabbit (Sigma) 1:500 (1 µg/mL), Sekundär-AK: POD-GaR 1:10.000 – CCRL2 ca. 39 kDa.

Bei Betrachtung und Interpretation des vorliegenden WB (Abbildung 32) muss beachtet werden, dass es während der Elektrophorese zu einer Fehllage des Gels kam, woraufhin sich die Signale für CCRL2 bei ca. 39 kDa in einer nach oben rechts ansteigenden Formation befinden. Auch unter Berücksichtigung dieser Fehllage des Gels ergeben sich minimal unterschiedliche Bandhöhen. Diese Abweichung kann unter anderem durch die differenzielle Glykosylierung in verschiedenen Zelllinien entstehen und wird in diesem Fall als die wahrscheinlichste Ursache in Kombination mit einer Fehllage des Gels angesehen. Das entsprechende Ergebnis für CCRL2 ist rotumrandet.

7 Diskussion

7.1 Die Rolle der Behandlung mit Chemerin in der Glukosehomöostase pankreatischer Nagerzellmodelle

Wie einleitend gezeigt, konnte CMKLR1 vor Beginn dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe in Glukagon-positiven α -Zellen des humanen Pankreas durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um humanes Pankreasgewebe, das im Rahmen von Tumoroperationen entfernt, vom Pathologen jedoch als normal beurteilt wurde. In Pankreasgewebe aus der Maus wiesen Takahashi et al. eine Koexistenz von CMKLR1 und Insulin nach. Dieser Arbeit lag somit die Hypothese zu Grunde, dass Chemerin als natürlicher Ligand von CMKLR1 einen Einfluss auf die Glukosehomöostase von Säugern haben könnte. Ob Chemerin Einfluss auf die Glukagonsekretion oder, wie die Präsentation von Takahashi et al. vermuten ließe, auf die Insulinsekretion, nehmen könnte war zunächst unklar und war auf Grund dieser unterschiedlichen Ergebnisse kontrovers zu diskutieren. Da durch die Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe ein Zusammenhang zwischen Glukagonsekretion und dem Chemerin-Rezeptor-System vermutet werden kann, wurde diese Hypothese in dieser Arbeit näher untersucht. Als Modell pankreatischer Inselzellen wurden die Nagerzelllinien INR1G9 und alpha TC 1 *in vitro* verwendet.

7.1.1 Glukagonsekretion von INR- Zellen in vitro

7.1.1.1 Physiologische Funktionen in der Glukosehomöostase von INR- Zellen

Zunächst wurde die Zelllinie auf ihre Funktionalität im physiologischen Sinne hin überprüft. Aus der Literatur ließ sich folgern, dass unter hypoglykämischen Bedingungen ein Anstieg der Glukagonproduktion zu erwarten sei.⁷²⁻⁷⁴ Dies sollte sich in einem Anstieg der Konzentration des Hormons im Medium widerspiegeln. Ebenso sollte sich unter hyperglykämischen Bedingungen ein Abfall der Glukagonkonzentration im Medium finden.⁷⁵⁻⁷⁷ Unter den im Versuch gegebenen Bedingungen konnte allerdings diese physiologische Reaktion der verwendeten Zellen nicht reproduziert werden. Hier kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht. Da die Zellen morphologisch betrachtet keinen Hinweis auf eine Fehlfunktion lieferten und auch keine Hinweise auf eine falsche Aussaat oder Infektion bestand, könnten äußere Umstände wie das Well-Format oder die Länge der Inkubationszeit die Produktivität der Zellen ungünstig beeinflussen. Eine Ursache für nicht sichtbare Fehlfunktionen von Zellen

könnte das Verwenden von unterschiedlichen Sublinien im Rahmen von zu hohen Passagezahlen sein. Die verwendeten INR-Zellen in dieser Arbeit hatten vergleichsweise hohe Passagezahlen (andere standen nicht zur Verfügung). Es könnte zu einer Akkumulation der zu messenden Substanz im Medium kommen, was ein Messen von geringen Änderungen der Konzentration ungünstig beeinflussen würde. Darüber hinaus wurde bei, auch nach drei Stunden Inkubation nur sehr geringen Mengen von Glukagon im Medium, auf eine weitere zeitliche Darstellung von Sekretion oder einer Verdünnungsreihe von Glukose im Medium zum Beispiel im 96 well Format verzichtet. Hier hätten noch kleinere Messgrößen das Ergebnis verfälschen können ohne weitere Erkenntnis zu gewähren. Zudem ergibt sich eine technische Herausforderung, da die Plasmakonzentration von Glukagon physiologisch zwischen 6-10 pmol/l liegt während Assays oft nur in Bereichen zwischen 10-15 pmol/l quantifizieren.⁴ Die Funktionalität wurde insofern hinreichend bewiesen, als dass nach drei Stunden Inkubation hinreichende Mengen an Glukagon nachgewiesen werden konnten, die auf eine stete Ausschüttung von Glukagon im Versuchsablauf schließen ließen. Es bleibt zu konstatieren, dass sie die hier verwendeten Zellen durch eine Änderung der Glukosekonzentration des Mediums in ihrer Glukagonsekretion nach drei Stunden Inkubationszeit nicht beeinflussbar waren, was unterschiedliche Glukosekonzentrationen als positiv oder negativ Kontrollen für eine dreistündige Inkubation der Zellen in Chemerin im nächsten Versuch ausschloss. Dennoch konnte in eine geeignete Positivkontrolle durch eine Beeinflussung der Glukagonsekretion gefunden werden. Das in der Literatur als Stimulator der Glukagonsekretion bekannte Forskolin^{78,79} konnte in einem weiteren Versuch auch die für diese Arbeit verwendeten INR Zellen in ihrer Sekretion von Glukagon signifikant stimulieren (vgl. Abbildung 7). Hier ließ sich einerseits die vorhandene Funktionalität der Zellen untermauern, andererseits konnte Forskolin in diesem Setting als geeignete Positivkontrolle für die Stimulation der Zellen verwendet werden.

7.1.1.2 Der Einfluss von Chemerin auf die Glukagonsekretion von INR – Zellen

Die drei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Mediums wurden trotz zunächst fehlender Reaktion der Zellen auf diese, im Sinne einer Sekretionssteigerung unter hypoglykämischen Bedingungen, weiter mitgeführt. Vor allem geschah dies auf Grund der einleitend erwähnten, großen Beeinflussung von Plasma-Glukosespiegeln auf die Glukagonsekretion im menschlichen Organismus. Tatsächlich ließ sich schließlich in

der Niedrigglukose-Gruppe ein signifikanter Abfall der Glukagonsekretion unter der Behandlung mit Chemerin nachweisen (vgl. Abbildung 7). Einleitend wurde beschrieben, dass die Funktion von Glukagon im menschlichen Organismus erst unterhalb physiologischer Glukosekonzentrationen relevant wird. Dieses Prinzip scheint sich hier wiederzufinden, da eine Behandlung mit Chemerin nur im Niedrigglukose-Bereich zu einer Beeinflussung der Glukosekonzentration im Zellmedium führt. Also nur in einem Bereich der Glukosekonzentration, in der die Glukagonsekretion für einen Organismus relevant wäre.

In einem anschließenden Versuch sollte die hemmende Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion mit der schon nachgewiesenen, die Sekretion steigernden Wirkung von Forskolin verglichen werden. Dazu wurde ein Versuchsmodell mit einer Vorinkubationszeit entworfen, in der die gleichzeitige und die nacheinander stattfindende Wirkung der Substanzen untersucht werden konnte. Der, die Glukagonsekretion steigernde Effekt von Forskolin konnte auch hier wieder signifikant nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte wieder eine hemmende Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion beobachtet werden, erwies sich jedoch nicht als signifikant (vgl. Abbildung 8). Kritisch zu betrachten ist hierbei der Verzicht auf eine Anpassung der Glukosekonzentration im Medium. Zur besseren Durchführbarkeit des Versuchs wurde an dieser Stelle auf die standardisierte Glukosekonzentration im Versuchsmedium (RPMI 1640) zurückgegriffen. Eine hemmende Wirkung von Chemerin auf die Glukagonsekretion von INR Zellen ist unter *low* Glukose Bedingungen nachgewiesen und sollte in weiteren Versuchen unter eben diesen Bedingungen untermauert werden. Hierzu könnten in der Zukunft auch humane oder tierische Inselzellen infrage kommen. Zwei Forschungsansätze könnten damit aufgegriffen werden. Einerseits könnte die Frage, ob Insulin oder Glukagon unter verschiedenen Bedingungen, im Speziellen unter verschiedenen Glukosekonzentrationen des Organismus, unterschiedliche Hierarchiestufen übernehmen, weiter verfolgt werden. Im Rahmen der Insulinresistenz liegen im T2DM Patienten neben hohen Glukosekonzentrationen auch erhöhte Glukagonspiegel vor, was sich physiologisch gesehen eigentlich widerspricht aber durch erhöhte Insulinspiegel ohne Aufnahme der Glukose in Zellen (Insulinresistenz) ermöglicht wird. Wie einleitend beschrieben, könnte es möglich werden den gestörten Stoffwechselkreislauf durch eine Suppression von Glukagon zu durchbrechen.^{19,23} Die vorliegenden Versuch zeigen jedoch bisher nicht

nachhaltig, dass Chemerin auch unter *high* Glukose Bedingungen Einfluss auf die Glukagonsekretion nehmen kann, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass die physiologische Wirkung von Chemerin in hypoglykämischen Stoffwechsellagen beheimatet ist. Hypoglykämische Stoffwechsellagen finden sich in Patienten mit T2DM häufig in den zur Gewichtsreduktion empfohlenen und durchgeführten Diäten. Diese durch die Beeinflussung des Glukagonspiegels zu unterstützen könnte Forschungsziel in weiterführenden Experimenten mit Chemerin sein.

7.1.2 Glukagonsekretion von Alpha TC1 Zellen in vitro

7.1.2.1 Physiologische Funktionen in der Glukosehomöostase von Alpha TC1 Zellen

Auch die alpha TC 1 Zellen wurden zunächst auf ihre Funktionalität im in vitro Versuch untersucht. Alle drei Zelllinien weisen einen ausreichend sicher zu detektierende Glukagonkonzentrationen im Zellkulturmedium auf (vgl. Abbildung 10). Die in 10 cm durchmessenden Petrischalen kultivierten Zellen zeigten jedoch keine konstante Glukagonsekretion obwohl nach 24 Stunden eine Akkumulation von Glukagon im Medium vorlag. Die gemessenen Werte sind vergleichbar mit zwei Studien, beide aus dem Jahr 2017, die aufzeigen, dass die kommerziell erhältlichen α TC 1 Zellen von ATCC in ihrer Funktion und auch in ihrem Genom von ihren ursprünglichen Primärenzelllinien abweichen und eher unbeständige Ergebnisse im Rahmen von Glukagon-Assays aufweisen.^{84,85} Erstaunlicher Weise findet sich jedoch in allen untersuchten Kulturmedien zwischenzeitlich auch ein Abfall der Glukagonkonzentration, was auf einen Verbrauch des Glukagons beim Zellstoffwechsel schließen lassen könnte. Der Klon alpha TC1 p. zeigte in diesem ersten Experiment eine besonders aktive Glukagonsekretion. Da das verwendete Zellkultur Medium einen sehr hohen Anteil an Glukose aufwies (25 mM), wurde anschließend das Verhalten des am produktivsten erscheinenden Klons auch in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Medium analysiert. Hier zeigte sich ebenfalls unter 25 mM Glukose im Medium ein zwischenzeitlicher Abfall der gemessenen Glukagonkonzentration, außerdem lag die gemessene Glukagonkonzentration in diesem *high* Glukosebereich, wie aus der Physiologie zu erwarten, unterhalb den gemessenen Werten unter der Verwendung von niedrigeren Glukosekonzentrationen des Mediums. Entgegen den Erwartungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 5,6 mM und 11 mM Glukose im Medium gemessen werden. Da es sich um eine Kultur von reinen Alphazellen handelt, die sich

nicht im Inselzellverbund befinden scheint bei fehlendem Insulineinfluss eine stete Überproduktivität der Zellen zu bestehen. Wie Abbildung 14 veranschaulicht, konnte bei den Alpha TC 1 Zellen, die zuvor bei den INR-Zellen präsentierte Wirkung von Forskolin nicht hervorgerufen werden. Hier ist jedoch anzumerken, dass der Basisversuch zur Behandlung der alpha TC1 Zellen (Abbildung 14) mit 25 mM Glukose enthaltendem Medium durchgeführt wurde. Da die zuvor gemessenen Glukagonkonzentrationen im Zellkulturmedium mit 25 mM Glukose am ehesten auf ein physiologisches Verhalten (absenken der Glukagonproduktion in *high* Glukose Medium) hindeutete, wurde der erwähnte Versuch in eben dieser Mediumkonzentration durchgeführt. In der Studie von David Davani *et al.* aus dem Jahr 2015 wurden ebenfalls α TC 1 Zellen von ATCC verwendet und die Autoren konnte stabilere Ergebnisse in Bezug auf die Glukagonsekretion dieser Zellen verzeichnen⁸⁶. Allerdings wurde der Versuchsaufbau zur Glukagonextraktion gänzlich anders gestaltet. Die Glukagonsekretion wurde ohne Zellkulturmedium mit einem Puffer von geringer Glukosekonzentration angeregt. Somit wurden Einflüsse des Zellkulturmediums ausgeschaltet, was in einer Fortführung der hier vorliegenden Versuche zu einer Stabilisierung der Ergebnisse führen könnte.

7.1.2.2 Der Einfluss von Chemerin auf die Glukagonsekretion von Alpha TC1 Zellen

In der weiteren Ausführung zu Abbildung 14 muss konstatiert werden, dass sich die Zellen in diesem Versuch nur schwerlich beeinflussen ließen. Es wurde jedoch ein Absinken der Glukagonsekretion des alpha TC1 p. Klons unter der Zugabe von Chemerin verzeichnet. Bei fehlenden Wiederholungsversuchen konnte jedoch hier keine Signifikanz bestätigt werden. Da hier ähnliche Ergebnisse vorliegen wie bereits zu den INR –Zellen präsentiert, sollte eine vergleichende Studie mit hohen Replikatzahlen zwischen INR-Zellen und alpha TC1 p. angestrebt werden. Insgesamt stellen die in den präsentierten Versuchen oft nur sehr geringen N-Zahlen die Limitation dieser Arbeit dar. So wird die Interpretierbarkeit der Ergebnisse herabgesetzt, weshalb die statistische Bewertung im Sinne Signifikanzanalyse unzureichend ausfällt. Abbildung 15 fasst die anschließend durchgeführten Versuche zum alpha TC 1 p. Klon zusammen. Bei nun vorliegenden, größeren Replikatzahlen ist eine Hemmung der Glukagonproduktion durch Chemerin nicht mehr zu verzeichnen. Ganz im Gegenteil erfahren die alpha TC1 p. Zellen unter größten Glukosekonzentrationen des Mediums einen signifikanten Anstieg ihrer Glukagonproduktion. Zusammen schauend betrachtet lässt sich daher

weder die hemmende noch steigernde Wirkung von Chemerin auf Nagerzellen (alpha Zellen) im *in vitro* Versuch sicher bestätigen oder verwerfen. Eine vorhandene Wirkung von Chemerin sollte jedoch auch nicht direkt von der Hand gewiesen werden. Gerade hier sollten die in dieser Arbeit die Signifikanzanalyse limitierenden, hier fehlenden Reproduktionen der Versuche, angeschlossen werden. Auffallend ist, dass die Behandlung mit Chemerin (speziell an den Punkten, an denen die Ergebnisse signifikant sind) immer den gegenteiligen Effekt bewirkt, der durch die Vorgabe des Glukosegehalts im Medium physiologischer Weise zu erwarten gewesen wäre. Unter geringen Glukosekonzentrationen im Medium bewirkt Chemerin bei INR-Zellen eine Verminderung der Glukagonsekretion, obwohl die Zellen physiologisch betrachtet eine Steigerung erfahren sollten. Gleiches Szenario in umgekehrter Weise ergibt sich bei den alpha TC1 p. Zellen unter hohen Glukosekonzentrationen. Auch hier zeigt sich der o.g. gegenläufige Effekt unter Chemerin. Hier sollten noch weitere vergleichende Studien vorgenommen werden. Der beschriebene Effekt sollte unter gleichen Bedingungen und in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen alpha-Zellen wiederholt werden. Weiter müsste auch die Wirkung von Chemerin auf Insulin weiter studiert werden. Die in der Einleitung gezeigten Immunfluoreszenzbilder von CMKLR1-gefärbten pankreatischen Inseln deuten in Zusammenschau mit den Ergebnissen hier daraufhin, dass Chemerin nicht nur eine spezielle Funktion übernimmt, sondern im Organismus als Transmitter fungiert und möglicher Weise mehrere Zellen (alpha wie beta Zellen) beeinflussen könnte. Daher sollten auch andere Formen von Alpha-Zellen untersucht werden, auch im Unterschied zum Verhalten der Zellen im Inselzellverbund. Inselzellen von Nagetieren könnten gewonnen und kultiviert werden, hier muss jedoch evaluiert werden, ob genug Zellen aus den Tieren zugewinnen sind. Darüber hinaus wurde als Fortsetzung der in dieser Arbeit aufgefallenen Effekte in unserem Labor an anderer Stelle eine Reihe von Versuchen mit humanen Inselzellen angestrebt. Sollte Chemerin sich als Gegenspieler zur Wirkung der Glukosekonzentration erweisen, ergäben sich im Hinblick auf die Diabetes-Forschung vielfältige, weitere Ansätze das Zusammenspiel von Insulin und Glukagon zu beeinflussen.

7.1.3 Der Einfluss einer Behandlung mit Chemerin auf die Glukagonsekretion von Alpha TC1 c6

Wie die Abbildung 9, Abbildung 13, Abbildung 15 und schließlich der Stimulationsversuch aus Abbildung 16 zeigen ist der Klon 6 der alpha TC 1 Zellen tatsächlich kaum in seiner Glukagon-Produktion zu beeinflussen und produziert annähernd konstante Mengen. Auch die Well-Größe konnte als beeinflussende Größe ausgeschlossen werden, wie Abbildung 19 darstellt. In der Immunfluoreszenz konnte die intrazelluläre Expression des Glukagons in den alpha TC 1 cl.6 Zellen bestätigt (s. Abbildung 17) werden. Im Vergleich der soeben genannten Abbildungen und Analyse der Abbildung 20 fällt jedoch auf, dass unter der Behandlung des Klon 6 mit Chemerin in den unterschiedlichen Settings immer konstante Mengen von Glukagon im Zellkulturmedium nach zu weisen sind, während die unbehandelten Zellen größere Unterschiede in der Sekretion zeigen. Unter Zugabe von GLP1 ist die Produktion von Glukagon geringer, nach 120min sieht man bei 100 nM GLP1 eine deutliche Hemmung der Produktion, wie aus der Literatur zu erwarten⁷⁸. Hier konnte eine erste Reaktion der Zellen auf eine aus der Literatur bekannte Substanz erzielt werden (s. Abbildung 21). In diesem und dem folgenden Versuch, dargestellt in den Abbildung 22 und Abbildung 23, zeigte sich jedoch letztlich ein entscheidender Hinweis auf die mögliche Beeinflussbarkeit der alpha TC1 cl. 6 Zellen. In den Proben, in denen Chemerin und GLP1 zusammen, also gleichzeitig, aufgetragen wurden, konnte beobachtet werden, dass die Zellen konstanter produzierten. Was an der nun gesunkenen Standardabweichung, die in den zuvor erfolgten Versuchen erhöht war, zusehen ist. Wobei auch hier in der Berechnungsgrundlage die Limitation in der N-Zahl besteht, weshalb eine Signifikanz nicht berechnet werden konnte. Darüber hinaus zeigt sich eine über die Zeit kontinuierlich geringere Menge an Glukagon im Zellkulturmedium. Dies beschreibt den auch schon zuvor beobachteten Zustand der Hemmung durch GLP1. Es konnte also beobachtet werden, dass Chemerin ein konstantes Konzentrationsniveau von Glukagon im Zellkulturmedium unter GLP1 Zugabe für die Hemmung der Glukagonproduktion hervorrief. Kombiniert man beide Substanzen erhält man eine konstante, kontinuierliche Hemmung der Glukagonausschüttung. Chemerin scheint den nur schwer zu beeinflussenden Klon 6 zu einer gleichmäßigen Produktion von Glukagon anzuregen und die Zellen für die Reaktionen auf den Inhibitor GLP1 empfänglicher zu machen. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die alpha TC1 Zellen Chemerin als eine Art übermittelnden Faktor zur Konstanten Sekretion von

Glukagon benötigen, was sich mit den Beobachtungen an den INR Zellen deckt und in Versuchsaufbauten mit größeren Replikatzahlen verifiziert werden sollten.

Auch in der Literatur wurde Chemerin bereits in seiner Funktion als Transmitter beschrieben. Das umfassende Review von Sinan Icin *et al.* fasst die 2016 bekannten und relevanten Aspekte von Chemerin in Bezug auf verschiedene Erkrankungen insbesondere im Bereich des Metabolischen Syndroms zusammen. Es wird deutlich, dass eine primäre Funktion von Chemerin nur selten nachgewiesen werden kann, während zum Beispiel bei der kardiovaskulären Arteriosklerose sekundäre Effekte von Chemerin eine wichtige Rolle spielen.⁸⁷ Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, diese sekundären Funktionen anstatt der direkten Wirkung von Chemerin auf die Sekretion von Inselzellen weiter zu eruieren. Bewusst wird hier auf die Sekretion von Inselzellen hingewiesen und nicht nur auf die Sekretion von alpha Zellen. Die eingangs erwähnten, widersprüchlichen Immunfluoreszenzanalysen von Inselzellen lassen in diesem Zusammenhang darauf schließen, dass indirekt möglicherweise alpha, wie auch beta Zellen von Chemerin zu beeinflussen sind. Das Vorhandensein von CMKLR1 in den alpha Zellen konnte durch die in dieser Arbeit gezeigten Versuche, letztendlich bestätigt werden. Wobei die geringen N-Zahlen dieser Versuche mit der daraus resultierenden Limitation der statistischen Interpretation nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Im Hinblick auf die gezeigten, widersprüchlichen Immunfluoreszenzanalysen bleibt zu konstatieren, diese erneut zu überprüfen und die Wirkung von Chemerin an β -Zellen parallel zu α -Zellen im Sekretionsassay mit ausreichend vielen Replikaten und sodann sicher zu interpretierenden Signifikanzen zu reevaluieren. Takahashi *et al.* konstatierte bereits 2011 im Rahmen der Veröffentlichung der einleitend erwähnten Immunfluoreszenz-Analysen an murinen Inselzellen, dass Chemerin die Funktion von β -Zellen reguliert und zeigte dies im Mausmodell *in vivo*¹. In wie weit hier allerdings eine direkte oder indirekte Steigerung der Insulinsekretion in den genetisch veränderten Mäusen vorliegt, kann nicht genau beschrieben werden. An INR-Zellen nachgewiesen scheint eine physiologische Funktion von Chemerin in der Beeinflussung von α -Zellen während der Hypoglykämie zu liegen. Eine These für weiterführende Analysen könnte in Zusammenschau der vorliegenden Befunde sein, dass Chemerin in hyperglykämischen Stoffwechsellagen eine Wirkung an β -Zellen einnimmt.

7.2 Die Expression von Chemerin-Rezeptoren in gut verfügbaren Tumorzelllinien

7.2.1 Der Nachweis von mCMKLR1 in Nagerzelllinien mittels BZ194

Wie die Tabellen und Abbildungen unter 6.3.2 darstellen konnte mittels BZ194 in den alpha TC 1 Zellen der Chemerinrezeptor nicht in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Obwohl auch mit der PFA und der Methanol/Aceton-Fixierung zwei Verfahren gegenübergestellt wurden blieb der Rezeptornachweis in den alpha TC 1 Zellen negativ. Lediglich der parentale Klon zeigte gelegentlich schwache Signale. Der Antikörper BZ194 konnte jedoch durch die Vorversuche an transfizierten HEK-Zellen sicher in seiner Funktionalität bestätigt werden. Erstaunlicher Weise zeigte sich der Antikörper aber nicht nur potent zu murinen Zellen, auch andere Nagerzelllinien konnten positiv auf mCMKLR1 getestet werden. Schließlich gelang auch der Nachweis des Rezeptors in den INR-Zellen. Dies passt zu den zunächst gezeigten *in vitro* Versuchen, in denen die INR-Zellen auch konstantere Ergebnisse lieferten als die alpha TC 1 Zellen. Es muss davon ausgegangen werden, dass auf Grund der Funktionsanalyse an den alpha TC 1 Zellen auch hier der Rezeptor vorliegt in der Immunfluoreszenz jedoch nicht nachzuweisen ist. Dies ist mit der erhöhten Sensitivität des signalverstärkenden Systems der Reizweiterleitung ins Zellinnere zu erklären, für die vergleichsweise wenig Rezeptormoleküle ausreichen. Die Immunfluoreszenz ist bekanntermaßen kein besonders empfindliches Nachweissystem. Insofern stellt die ausbleibende Reaktion in der Färbung bei gleichzeitiger Funktion des Rezeptors keine Diskrepanz dar. Abschließend zu klären bleibt, welches Verhalten von mCMKLR1 und Chemerin physiologisch ist und welches pathologisch. Genauer gesagt, geht aus den vorliegenden Versuchen klar hervor, dass Chemerin und CMKLR1 ihren Platz in der Glukosehomöostase haben. Es bleibt aber unklar ob sie nur dann funktional werden, wenn pathologische Zustände der Homöostase auftreten oder ob sie einen ständigen Anteil an der Sicherung der Glukosehomöostase in menschlichen oder tierischen Organismen haben. Hier gilt es in weiterführenden Studien die Funktionsanalyse von Chemerin im Inselzellverbund durchzuführen. Darüber hinaus bedarf es weiterhin sicherer Nachweismethoden des Rezeptors. Potente Antikörper liegen hierzu bereits vor, dennoch liefern unterschiedliche Verfahren und Zellen differente Ergebnisse.

7.2.2 Der Nachweis von Chemerin-Rezeptoren in humanen Tumorzelllinien

Die Datenbank zeigt einige humane Zelllinien in denen CMKLR1 sicher nachgewiesen wurde, doch wie bereits der direkte Rezeptornachweis an murinen Zellen gelingt auch der Nachweis von CMKLR1-mRNA mittels qPCR nur schwer bis gar nicht. In Zelllinien, in denen der eindeutige Nachweis mittel qPCR gelang, konnten die Ergebnisse auch im Western Blot reproduziert werden. Hier zeigt sich wieder, dass die verwendeten Antikörper sicher detektieren aber der Nachweis nur in einigen Ziellinien gelingt. Es stellt sich erneut die Frage ob der Rezeptor bzw. eine mRNA nur unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel in pathologischen Settings der Glukosehomöostase, sicher nachzuweisen sind. Von ausreichendem Vorhandensein für weitere Funktionalitäts-Versuche kann für CMKLR1 in den DU4475 Zellen und für CCRL2 in MDA-MB-231 Zellen ausgegangen werden. Gerade mit der DU4475 Zelllinie würde es sich anbieten weitere Migrationsassays und Wachstumsanalysen im Tumorgewebe durchzuführen. Im direkten Vergleich der nachgewiesenen Rezeptoren zeigte sich eine weitere Auffälligkeit. So zeigte sich CMKLR1 in DU4475 Zellen sicher und reproduzierbar deutlich nachweisbar, während CCRL2 gar nicht detektiert werden konnte umgekehrter Weise zeigten die MDA-MB-231 Zellen hohe CCRL2 Werte bei nicht zu detektierendem CMKLR1. Dies könnte auf eine sich bedingende Abhängigkeit zwischen den zwei für Chemerin potenten Rezeptoren hindeuten und sollte weiterverfolgt werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, Kitazawa R, Fujimoto W, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kiyonari H, Abe T, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K, Takahashi Y. Chemerin regulates beta-cell function in mice. *Scientific reports* 2011;1:123.
2. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology* 2008;199:5-19.
3. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005;184:285-93.
4. Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* 2011;153:1039-48.
5. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847-53.
6. Raju B, Cryer PE. Maintenance of the postabsorptive plasma glucose concentration: insulin or insulin plus glucagon? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E181-6.
7. Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, Turner RC. Understanding "insulin resistance": Both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism* 1991;40:908-17.
8. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
9. Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Meelheim D, Dohm GL. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation* 1987;79:1330-7.
10. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 2000;106:171-6.
11. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. *The American journal of cardiology* 1999;84:3J-10J.
12. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* 1992;35:389-97.
13. Taylor R. Type 2 diabetes: etiology and reversibility. *Diabetes care* 2013;36:1047-55.
14. Johnson DG, Goebel CU, Hruba VJ, Bregman MD, Trivedi D. Hyperglycemia of diabetic rats decreased by a glucagon receptor antagonist. *Science (New York, NY)* 1982;215:1115-6.
15. Brand CL, Jorgensen PN, Knigge U, Warberg J, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ. Role of glucagon in maintenance of euglycemia in fed and fasted rats. *The American journal of physiology* 1995;269:E469-77.
16. Brand CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ. Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1994;37:985-93.
17. Qureshi SA, Candelore MR, Xie D, Yang XD, Tota LM, Ding VDH, Li ZH, Bansal A, Miller C, Cohen SM, Jiang GQ, Brady E, Saperstein R, Duffy JL, Tata JR, Chapman KT, Moller DE, Zhang BB. A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagon-mediated biological effects. *Diabetes* 2004;53:3267-73.

18. D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2011;13 Suppl 1:126-32.
19. Petersen KF, Sullivan JT. Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans. *Diabetologia* 2001;44:2018-24.
20. Scheen AJ, Paquot N, Lefebvre PJ. Investigational glucagon receptor antagonists in Phase I and II clinical trials for diabetes. *Expert opinion on investigational drugs* 2017;26:1373-89.
21. Christensen M, Bagger JI, Vilsboll T, Knop FK. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *The review of diabetic studies : RDS* 2012;8:369-81.
22. Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, Barnett AH. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *The Lancet* 2011;378:182-97.
23. Bailey CJ, Tahrani AA, Barnett AH. Future glucose-lowering drugs for type 2 diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016;4:350-9.
24. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
25. Moebus S, Hanisch J, Bramlage P, Losch C, Hauner H, Wasem J, Jockel KH. Regional differences in the prevalence of the metabolic syndrome in primary care practices in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:207-13.
26. Ott P, Köhler C, Hanefeld M. Grunddaten der „Diabetes in Deutschland“-Studie (DIG). *Der Diabetologe* 2006;2:S44-S8.
27. Abholz H-H, Gries A, Haller N, Landgraf R, Matthaei S, Müller UA, Spranger J, Suchowerskyj A, Toeller M. Therapie des Typ-2-Diabetes. *AWMF Leitlinie* 2013; nvl-001g.
28. DeFronzo RA. Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Overview of newer agents: where treatment is going. *The American journal of medicine* 2010;123:S38-48.
29. Wirth A, (DAG). Prävention und Therapie der Adipositas. *awmf S3 Leitlinie* 2014;2.0.
30. Hanefeld M, Brunetti P, Schernthaner GH, Matthews DR, Charbonnel BH. One-year glycemic control with a sulfonylurea plus pioglitazone versus a sulfonylurea plus metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2003;27:141-7.
31. Schernthaner G. [Progress in the prevention of type 2 diabetes]. *Wiener klinische Wochenschrift* 2004;115:745-57.
32. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition* 2007;92:347.
33. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007;148:4687-94.
34. Sell H, Launcikienė J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigs A, Arner P, Eckel J. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 2009;58:2731-40.
35. Fatima SS, Rehman R, Baig M, Khan TA. New roles of the multidimensional adipokine: chemerin. *Peptides* 2014;62:15-20.
36. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *The Journal of experimental medicine* 2003;977-85.

37. Berg V, Sveinbjornsson B, Bendiksen S, Brox J, Meknas K, Figenschau Y. Human articular chondrocytes express ChemR23 and chemerin; ChemR23 promotes inflammatory signalling upon binding the ligand chemerin(21-157). *Arthritis research & therapy* 2010;12:R228.
38. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, Lebherz C, Tittus J, Reiser M, Becker C, Goke B, Leber AW, Parhofer KG, Broedl UC. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2009;161:339-44.
39. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemerin reveals its chimeric nature. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:2187-90.
40. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:34661-6.
41. Oswiecimska JM, Ziora KT, Suwala A, Swietochowska E, Gorczyca P, Ziora-Jakutowicz K, Machura E, Szczepanska M, Ostrowska Z, Ziora D, Szalecki M, Stojewska M, Matusik P, Malecka-Tendera E. Chemerin serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro endocrinology letters* 2014;35:490-6.
42. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, Svestak M. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2008;152:217-21.
43. Kim SH, Lee SH, Ahn KY, Lee DH, Suh YJ, Cho SG, Choi YJ, Lee DH, Lee SY, Hong SB, Kim YS, Jeon JY, Nam M. Effect of lifestyle modification on serum chemerin concentration and its association with insulin sensitivity in overweight and obese adults with type 2 diabetes. *Clinical endocrinology* 2014;80:825-33.
44. Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology* 2006;147:2458-67.
45. Sell H, Eckardt K, Taube A, Tews D, Gurgui M, Van Echten-Deckert G, Eckel J. Skeletal muscle insulin resistance induced by adipocyte-conditioned medium: underlying mechanisms and reversibility. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E1070-7.
46. Ernst MC, Issa M, Goralski KB, Sinal CJ. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology* 2010;151:1998-2007.
47. Hansen IR, Jansson KM, Cannon B, Nedergaard J. Contrasting effects of cold acclimation versus obesogenic diets on chemerin gene expression in brown and white adipose tissues. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1841:1691-9.
48. Fredriksson R, Gloriam DE, Hoglund PJ, Lagerstrom MC, Schioth HB. There exist at least 30 human G-protein-coupled receptors with long Ser/Thr-rich N-termini. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;301:725-34.
49. Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 2008;7:339-57.
50. Zyryanova T, Schneider R, Adams V, Sittig D, Kerner C, Gebhardt C, Ruffert H, Glasmacher S, Hepp P, Punkt K, Neuhaus J, Hamann J, Aust G. Skeletal muscle expression of the adhesion-GPCR CD97: CD97 deletion induces an abnormal structure of the sarcoplasmic reticulum but does not impair skeletal muscle function. *PloS one* 2014;9:e100513.

51. Walker JK, Fisher JT. Editorial overview: Respiratory: GPCR signaling and the lung. *Current opinion in pharmacology* 2014;16:iv-vi.
52. Tang CM, Insel PA. GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends in cardiovascular medicine* 2004;14:94-9.
53. Emery AC, Eiden MV, Mustafa T, Eiden LE. Rapgef2 connects GPCR-mediated cAMP signals to ERK activation in neuronal and endocrine cells. *Science signaling* 2013;6:ra51.
54. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* 2005;57:279-88.
55. Chalmers DT, Behan DP. The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nature reviews Drug discovery* 2002;1:599-608.
56. Gantz I, Konda Y, Yang YK, Miller DE, Dierick HA, Yamada T. Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors. *Cytogenetics and cell genetics* 1996;74:286-90.
57. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *The Journal of experimental medicine* 2005;201:509-15.
58. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *Journal of immunology* 2005;174:244-51.
59. Zabel BA, Ohyama T, Zuniga L, Kim JY, Johnston B, Allen SJ, Guido DG, Handel TM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Experimental hematology* 2006;34:1106-14.
60. Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, Tejeda NM, Monnier J, Swanson CD, Holzer AK, Gentles AJ, Sperinde GV, Edalati A, Hadeiba HA, Alizadeh AA, Butcher EC. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *The Journal of experimental medicine* 2012;209:1427-35.
61. Schefer Q, Basel, Prof. Dr. Rupert M, Dr. Carsten G. Herstellung neuer GPCR-Antikörper für die Zielstrukturvalidierung in dergerichteten Tumor-Diagnose und -Therapie [Selbstständige Publikationen]2012.
62. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:64-9.
63. Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine & growth factor reviews* 2011;22:331-8.
64. Reverchon M, Rame C, Bertoldo M, Dupont J. Adipokines and the female reproductive tract. *International journal of endocrinology* 2014;2014:232454.
65. Rourke JL, Muruganandan S, Dranse HJ, McMullen NM, Sinal CJ. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *The Journal of endocrinology* 2014;222:201-15.
66. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 2008;135:561-71.
67. Monnier J, Lewen S, O'Hara E, Huang K, Tu H, Butcher EC, Zabel BA. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. *Journal of immunology* 2012;189:956-67.

68. Zabel BA, Nakae S, Zuniga L, Kim JY, Ohyama T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:2207-20.
69. Jeng YJ, Townsend CM, Jr., Nagasawa S, Chuo S, Kern K, Yanaihara N, Ferrar RS, Hill FL, Thompson JC, Greeley GH, Jr. Regulation of pancreastatin release from a human pancreatic carcinoid cell line in vitro. *Endocrinology* 1991;128:220-5.
70. Baroni MG, Cavallo MG, Mark M, Monetini L, Stoehrer B, Pozzilli P. Beta-cell gene expression and functional characterisation of the human insulinoma cell line CM. *The Journal of endocrinology* 1999;161:59-68.
71. Takaki R, Ono J, Nakamura M, Yokogawa Y, Kumae S, Hiraoka T, Yamaguchi K, Hamaguchi K, Uchida S. Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 1986;22:120-6.
72. Desouza CV, Bolli GB, Fonseca V. Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular events. *Diabetes care* 2010;33:1389-94.
73. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews* 2007;28:84-116.
74. Rickels MR, Najj A. Reactive hypoglycaemia following GLP-1 infusion in pancreas transplant recipients. *Diabetes, obesity & metabolism. England* 2010;731-3.
75. Kaneko K, Shirotani T, Araki E, Matsumoto K, Taguchi T, Motoshima H, Yoshizato K, Kishikawa H, Shichiri M. Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes research and clinical practice* 1999;44:83-92.
76. Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Mohler H, Ostenson CG, Smith PA. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels. *Nature* 1989;341:233-6.
77. Yoshimoto Y, Fukuyama Y, Horio Y, Inanobe A, Gotoh M, Kurachi Y. Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet alpha cells by activating a G protein-gated K⁺ channel. *FEBS letters* 1999;444:265-9.
78. De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Habib AM, Moritoh Y, Zhang E, Reimann F, Rosengren AH, Shibasaki T, Gribble F, Renström E, Seino S, Eliasson L, Rorsman P. GLP-1 Inhibits and Adrenaline Stimulates Glucagon Release by Differential Modulation of N- and L-Type Ca²⁺ Channel-Dependent Exocytosis. *Cell Metabolism* 2010;11:543-53.
79. Hermansen K. Forskolin, an activator of adenylate cyclase, stimulates pancreatic insulin, glucagon, and somatostatin release in the dog: studies in vitro. *Endocrinology* 1985;116:2251-8.
80. Cejvan K, Coy DH, Efendic S. Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes* 2003;52:1176-81.
81. Rezanian A, Riedel MJ, Wideman RD, Karanu F, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Production of functional glucagon-secreting alpha-cells from human embryonic stem cells. *Diabetes* 2010;60:239-47.
82. Pipeleers DG, Schuit FC, Van Schravendijk CF, Van de Winkel M. Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology* 1985;117:817-23.

83. Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, Drucker DJ. beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 2005;54:482-91.
84. Ikenouye LM, University of D. Characterization of the ATCC α -TC1-6 Pancreatic Alpha Cell Line to Study Glucagon Secretion: University of Denver; 2017.
85. Stitzel NL, Ahrim Y, Romy K, Duygu U, Michael L. Alpha TC1 and Beta-TC-6 genomic profiling uncovers both shared and distinct transcriptional regulatory features with their primary islet counterparts. *Scientific reports* 2017;7:11959.
86. Davani D, Kumar S, Palaia T, Hall C, Ragolia L. Lipocalin-type prostaglandin D2 synthase reduces glucagon secretion in alpha TC-1 clone 6 cells via the DP1 receptor. *Biochemistry and biophysics reports* 2015;4:224-7.
87. Inci S, Aksan G, Dogan P. Chemerin as an independent predictor of cardiovascular event risk. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2016;7:57-68.
88. Shin WJ, Zabel BA, Pachynski RK. Mechanisms and Functions of Chemerin in Cancer: Potential Roles in Therapeutic Intervention. *Frontiers in Immunology* 2018;9:2772.
89. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew WC, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN. Insulin Signaling in α Cells Modulates Glucagon Secretion In Vivo. *Cell Metabolism* 2009;9:350-61
90. Gromada J, Duttaroy A, Rorsman P. The Insulin Receptor Talks to Glucagon? *Cell Metabolism* 2009;9:303-5

9 Anhang

9.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Annika Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das Chemerin-Rezeptor-System in seinem Einfluss auf die Glukosehomöostase von Nagerzellen und sein Vorkommen in humanen Tumorzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9.3 Danksagung

An erster Stelle richte ich meinen Dank an PD Dr. rer. nat. Peter Kobelt, der als mein Doktorvater, die Realisation dieser Arbeit möglich machte.

Mein Dank gilt Dr. Carsten Grötzinger, der mein Interesse an der Forschung erkannte und mir die Möglichkeit bot unter seiner Leitung in der AG Grötzinger das wissenschaftliche Arbeiten und die dazu notwendigen Techniken zu erlernen und schließlich im Rahmen der Forschung an Chemerin und seinen Rezeptoren umzusetzen. Er half mir bei der Erarbeitung des Konzepts für die Arbeit, unterstützte mich in der Weiterentwicklung der Versuchsaufbauten und stellte mir die Erfahrung und Expertise seines Labors sowie die notwendigen Materialien und Zelllinien zur Verfügung. Gleichzeitig danke Prof. Dr. Wiedenmann, an dessen Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie meine Doktorarbeit durchgeführt wurde.

Mein bester Dank geht an die Mitarbeiter der AG Grötzinger, im besonderen Yvonne Giesecke, die mich mit allen in dieser Arbeit angewandten wissenschaftlichen Methoden vertraut machte und mich mit ihrer langjährigen Fachkenntnis in allen Fragen unterstützte. Ines Eichhorn danke ich für die Immunfluoreszenz-Analyse von CMKLR1, Chemerin und Insulin in Maus-Inselzellen. Ebenfalls richte ich meinen Dank an Jan Körner, der mir das Verfahren und die Normierung der qPCR erklärte. Ich danke Sandy Hallmann, die mir stets und geduldig bei allen Fragen zu WesternBlot, ELISA und RNA/DNA-Präparation sowie der Anwendung der Zellkultur zur Seite stand. Darüber hinaus danke ich Sandy Hallman für die stets professionelle Zusammenarbeit im Labor und ihre bis heute währende Freundschaft.

Am Ende danke ich meiner Familie für ihr Verständnis und die anhaltende moralische, aber auch finanzielle Unterstützung.