

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin IV

**(Schwerpunkt: Endokrinologie, Diabetologie,
Angiologie, Nephrologie und Klinische Chemie)**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-U. Häring

**Untersuchungen zur adipogenen Wirkung von Insulin
Detemir auf 3T3-L1-Prädipozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Anja Andrea Böhm
aus Aschaffenburg**

2012

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H.-U. Häring

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

3. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H.-G. Joost

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	DIABETES MELLITUS UND SEINE BEDEUTUNG IN DER HEUTIGEN GESELLSCHAFT	- 1 -
1.2	INSULIN – GESCHICHTE, REZEPTOR UND WIRKUNG	- 3 -
1.3	INSULINANALOGA	- 11 -
1.4	INSULIN DETEMIR	- 13 -
1.5	FETTZELLEN	- 16 -
1.6	FETTZELLDIFFERENZIERUNG	- 17 -
1.7	FRAGESTELLUNG	- 18 -
2.	MATERIAL UND METHODIK	- 19 -
2.1	CHEMIKALIEN	- 19 -
2.2	ZELLKULTUR	- 21 -
2.3	ZELL-LYSATE	- 23 -
2.4	BESTIMMUNG DER GPDH-AKTIVITÄT	- 23 -
2.5	BESTIMMUNG DES ZELLULÄREN PROTEINS	- 23 -
2.6	ÖL-ROT-FÄRBUNG	- 24 -
2.7	QUANTITATIVE REAL-TIME-RT-PCR	- 24 -
2.8	STATISTIK	- 25 -
3.	ERGEBNISSE	- 26 -
3.1	BSA HEMMT DIE FETTZELLDIFFERENZIERUNG	- 26 -
3.2	KONZENTRATIONSABHÄNGIGE ADIPOGENITÄT DETEMIRS	- 29 -
3.3	ETABLIERUNG EINES ZELLKULTURPROTOKOLLS	- 31 -
3.4	DETEMIR IST WENIGER ADIPOGEN ALS HUMANINSULIN	- 32 -
3.4.1	UNTERSUCHUNGEN AUF ENZYMATISCHER EBENE	- 32 -
3.4.2	UNTERSUCHUNGEN AUF MORPHOLOGISCHER EBENE	- 35 -

3.4.3	UNTERSUCHUNGEN AUF EBENE DER GENEXPRESSION	37 -
4.	DISKUSSION.....	40 -
5.	ZUSAMMENFASSUNG	46 -
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	48 -
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	49 -
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	50 -
9.	DANKSAGUNG	62 -
10.	LEBENS LAUF.....	64 -

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus und seine Bedeutung in der heutigen Gesellschaft

Diabetes mellitus ist eine durch Hyperglykämie gekennzeichnete chronische metabolische Erkrankung, die durch insuffiziente Insulinsekretion und/oder mangelnde Insulinsensitivität hervorgerufen wird. Sie wird in zwei Hauptgruppen unterteilt: Diabetes Typ 1, der mit absolutem Insulinmangel einhergeht (5-10% aller diagnostizierten Diabetiker), des Weiteren Diabetes Typ 2 (90-95%) mit starker genetischer Prädisposition [Barnett, AH et al. 1981], bei dem neben der Insulinsekretionsstörung die Insulinresistenz im Vordergrund steht und man von relativem Insulinmangel spricht. Außerdem weitere spezifische Diabetes-Formen sowie Schwangerschaftsdiabetes [AmericanDiabetesAssociation 2008].

Mit weltweit 171 Millionen Betroffenen im Jahr 2000 stellt Diabetes mellitus eine Epidemie der heutigen Gesellschaft dar. Bis zum Jahr 2030 wird sich die Zahl der Erkrankten nach Schätzungen auf etwa 366 Millionen Betroffene mehr als verdoppeln [Wild, S et al. 2004]. Dem massiven Anstieg der Zahl adipöser Kinder und Jugendlicher folgt eine drastische Zunahme des Typ 2-Diabetes im Kindes- und Jugendalter, bisher vornehmlich in den USA und Asien [Kapellen, TM et al. 2004; Wabitsch, M et al. 2004]. Deutschland liegt bei der für 2010 erwarteten Diabetes-Prävalenz mit 12% im europaweiten Vergleich auf dem zweiten Rang, der europäische Durchschnitt bei 8,6% [InternationalDiabetesFederation 2010]. Im Jahr 2001 beliefen sich die jährlichen Zusatzkosten pro diabetischem Patient bei einer Prävalenz von fast 7% (standardisiert auf die deutsche Wohnbevölkerung) [Hauner, H et al. 2003] auf ca. 4000 Euro, wobei ca. 80% der Kosten durch die vermeidbaren Folgen des Diabetes verursacht wurden [Hauner, H 2006]. Ein wesentlicher Anteil daran beruht auf den Folgeerkrankungen des Diabetes: mikro- und makrovaskuläre Angiopathien wie Nephropathie, Retinopathie und kardiale, zerebrale und periphere Ereignisse sowie Kataraktentstehung und Neuropathie.

Einleitung

In zwei großangelegten Studien, der DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group) und der UKPDS (UK Prospective Diabetes Study Group) wurde gezeigt, dass eine normoglykämie Einstellung des Diabetes das Eintreten bzw. das Fortschreiten der mikrovaskulären Komplikationen signifikant verzögert [DCCT 1993; UKPDS 1998]. Diese Normoglykämie kann bei einigen Patienten durch Gewichtsreduktion, Bewegung und/oder orale Antidiabetika erreicht werden [AmericanDiabetesAssociation 2008]; Typ 1- Diabetiker benötigen jedoch von Beginn an Insulin; bei Typ 2-Diabetikern haben 10 Jahre nach Therapiebeginn mit oralen Antidiabetika ca. 80% eine Insulintherapie begonnen [Schatz, H 2006].

1.2 Insulin – Geschichte, Rezeptor und Wirkung

Mit der Extraktion von Insulin aus Pankreasgewebe durch Banting, Best, Collip und MacLeod im Jahr 1921 begann die Revolution der Diabetestherapie [Owens, DR et al. 2001]. Gereinigtes Rinder- und Schweine-Insulin wurde die Standardtherapie des Diabetes mellitus Typ 1. 1955 konnte Frederick Sanger die komplette Aminosäuresequenz des menschlichen Insulins bekannt geben, sodass in den frühen 80er Jahren durch die Erfindung der rekombinanten DNA-Technologie durch Axel Ullrich [Sures, I et al. 1980; Ullrich, A et al. 1977] die biosynthetische Großproduktion des Humaninsulins mittels Bakterien bzw. Hefepilzen begonnen wurde.

Insulin (siehe Abb. 1 S. - 4 -) ist ein Protein aus 51 Aminosäuren, das aus zwei Polypeptiden (einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 30 Aminosäuren) besteht, die durch zwei Disulfidbrücken (A7/B7; A20/B19) und eine weitere Bindung innerhalb der A-Kette (A6/A11) verbunden sind [Derewenda, U et al. 1989].

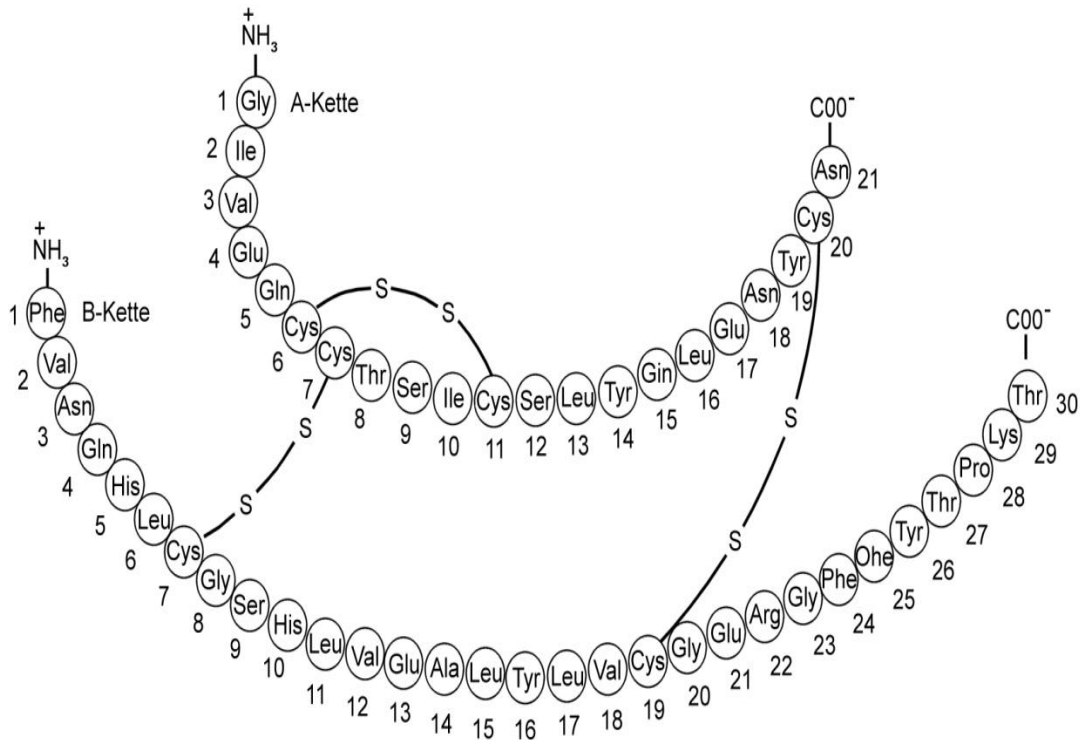


Abb. 1 Primärstruktur des Humaninsulins; Bezeichnung der Aminosäuren nach dem üblichen 3-Buchstaben-Code

Physiologischerweise wird Insulin von den β -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln sezerniert [Waldhausl, WK 1986]. Im Anschluss an die Synthese erfolgt dort - über die Vorstufen [Steiner, DF et al. 1967] Präproinsulin und Proinsulin sowie nach Abspaltung des C-Peptids – die Speicherung als kristalline Hexamere in speziellen Sekretgranula, die sich vom Golgi-Apparat abschnüren [Dunn, MF 2005; Emdin, SO et al. 1980]. Die Hexamere entstehen unter Anwesenheit von zwei Zink-Ionen bei neutralem pH aus drei Dimeren. [Blundell, TL et al. 1972; Brange, J et al. 1993]

Die Ausschüttung erfolgt pulsatil [Lang, DA et al. 1979] in die Pfortader und erfährt 30-60 Minuten nach Nahrungsaufnahme ein Maximum. Zwei bis drei Stunden postprandial ist die Blutglukose durch die Insulinwirkung wieder zu ihrer basalen Konzentration zurückgekehrt [Owens, DR et al. 2001]. Der stärkste Reiz für die Insulinsekretion ist ein erhöhter Plasmaglukosespiegel [Newsholme, P et al. 2010], die Glukoseänderung ist hierbei der Insulinsekretionsänderung nur zwei Minuten voraus [Houslay, MD et al. 1989; Lang, DA et al. 1979]. Auch einige Aminosäuren (v.a. Arginin), Fettsäuren und Ketonkörper können die Sekretion verstärken [Ishiyama, N et al. 2006; Löffler, G et al. 2007]. Ebenso Entero hormone, auch als Inkretine bezeichnet, wie zum Beispiel das gastroinhibitorische Peptid oder das Glukagon-like-peptide-1 stimulieren die Insulinantwort auf Mahlzeiten [Creutzfeldt, W 1979; Henquin, JC et al. 2003], was mit Inkretinmimetika wie zum Beispiel Exenatide auch therapeutisch genutzt wird [Gallwitz, B 2010; Nauck, MA et al. 2003].

Nach der Sekretion zerfallen die Insulinhexamere in Di- und Monomere, wodurch sie an Insulinrezeptoren binden können [Löffler, G 2007].

Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres Transmembranprotein und besteht aus zwei identischen Untereinheiten (2 extrazelluläre α -Untereinheiten, 2 β -Untereinheiten mit Transmembrandomänen und intrazellulärer Tyrosin-Kinase-Aktivität [Kasuga, M et al. 1982], die ihn zur Autophosphorylierung befähigen [Ballotti, R et al. 1989; Rosen, OM 1987; White, MF et al. 1984].

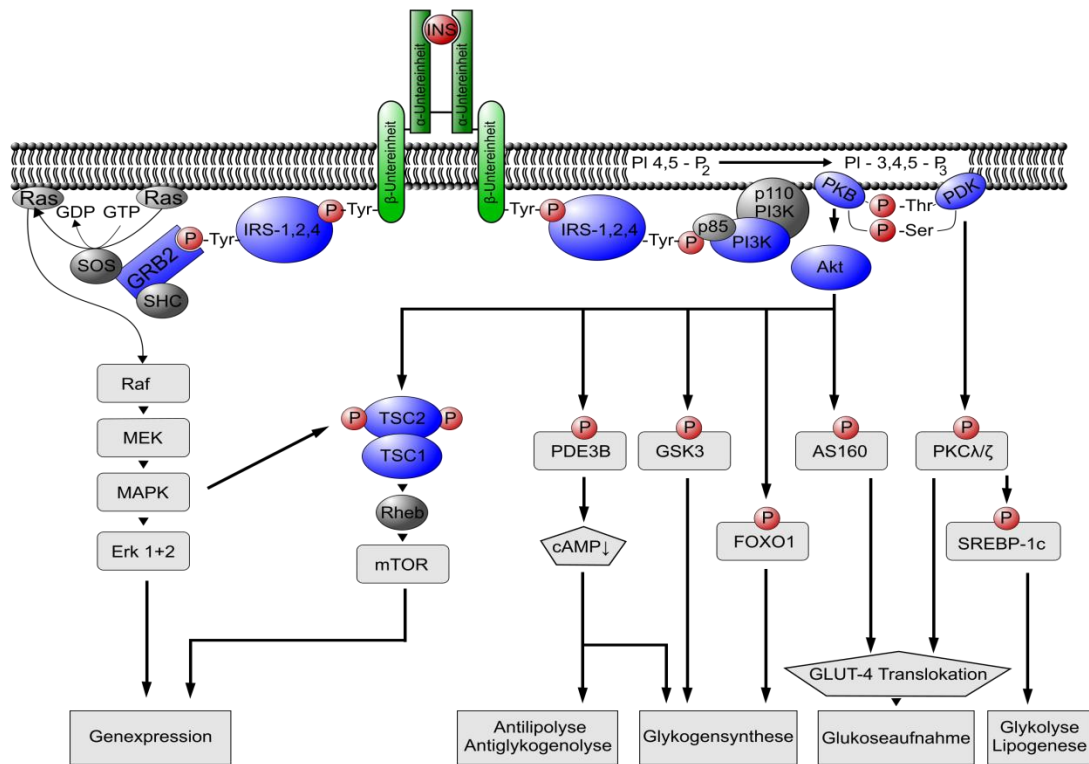


Abb. 2 Ausschnitte aus der Insulinsignaltransduktion; frei nach [Choi, K et al. 2010; Hirsch, IB 2005; Löffler, G and (Hrsg.) 2007; Schatz, H 2006; Sliker, LJ et al. 1997]

Für die Rezeptorbindung sind nach heutigen Erkenntnissen vor allem folgende Aminosäuren des Insulins verantwortlich: A 1-5, 16, 19 und B 12, 15-16, 23-26 (s.a. Abb. 1 auf Seite - 4 -) [De Meyts, P 2004; Schell, U et al. 2000].

Pro Rezeptor bindet bei physiologischen Insulinkonzentrationen mit hoher Affinität nur ein Insulinmolekül [Lee, J et al. 1994; Ottensmeyer, FP et al. 2000]. Nach Insulinbindung leitet der Rezeptor das Signal durch Konformationsänderung, Autophosphorylierung und Bindung verschiedener Bindemoleküle (IRS-1 bis -4, Shc, Grb2, ...; s. Abb. 2) ins Zytosol weiter [Houslay, MD et al. 1989; Keller, SR et al. 1993; Perlman, R et al. 1989; Ullrich, A et al. 1985; White, MF 1997; White, MF et al. 1988; White, MF et al. 1998].

Einleitung

Je nach Bindeproteinen stehen zwei hauptsächliche Signalkaskaden zur Verfügung: über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mit folgender Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) zu den metabolischen Effekten des Insulins, über Shc, GRB2, SOS, Ras und folgender Aktivierung der MAPK zu den mitogenen und differenzierungsauslösenden Effekten [Capeau, J 2005; White, MF 1997]. Im folgenden Abschnitt werden diese Wirkungen dargestellt.

Leber	Fettgewebe	Muskel
Glukosemetabolisierungsrate ↑	Glukoseaufnahme ↑	Glukoseaufnahme ↑
cAMP-Konzentration ↓	Glykolyserate ↑	Glykogensynthese ↑
Glukoneogenese ↓	Fettsäure-Biosynthese ↑	Glykogenolyse ↓
Glykolyse ↑	Lipolyse ↓	Glykolyserate ↑
Glykogensynthese ↑	K ⁺ -Aufnahme ↑	K ⁺ -Aufnahme ↑
Glykogenolyse ↓		AS-Transport ↑
Ketonkörperproduktion ↓		Proteinbiosynthese ↑

Tabelle 1: Insulinwirkung auf die wichtigsten Erfolgsorgane; wichtig aufgrund ihrer Masse, des hohen Rezeptorbesatzes [White, MF et al. 1994] und ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel; die Mitogenität ist nicht separat aufgeführt, trifft aber für alle Gewebe zu; FS = Fettsäure; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; K⁺ = Kalium; AS = Aminosäure; nach [Löffler, G 2007; Saltiel, AR et al. 2001]

Die meisten der beschriebenen Insulinwirkungen treten mit einer Latenz im Sekunden- bis Minutenbereich auf. Die Effekte des Insulins im Bereich des Wachstums und der Genregulation werden erst innerhalb von Stunden (30 Minuten bis 2h) wirksam [Lamph, WW et al. 1988]. Insulin greift dabei regulierend in die Transkription und Translation von mehr als 2000 Genen [Guo, X et al. 2000; O'Brien, RM et al. 2001] ein; meist kodieren sie für Schlüsselenzyme im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Induktion und Repression verschiedener Gene sind beide möglich und kommen parallel vor [Mounier, C et al. 2006]. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ist Insulin ein anabol wirkendes Hormon, das wichtigste des Organismus [Saltiel, AR et al. 2001].

Der Abbau des Insulins kann grundsätzlich von allen insulinsensitiven Geweben durchgeführt werden; hauptsächlich findet er jedoch über Enzyme in Leber und Niere statt. Die Leber ist der Hauptort der Metabolisierung [Rabkin, R et al. 1986], ca. 50% des portalvenösen Insulins unterliegen dem first-pass-Effekt [Duckworth, WC et al. 1998]. Auch in der Niere erfolgt ein großer Teil des Abbaus, einmal durch glomeruläre Filtration mit folgender tubulärer Reabsorption, des Weiteren über Diffusion mit anschließender Bindung und Wirkung an Tubuluszellen [Rabkin, R et al. 1984].

Nach Bindung wird der Insulin-Insulinrezeptor-Komplex internalisiert, der Rezeptor abgekoppelt und an die Zelloberfläche zur erneuten Verwendung zurückgegeben [Foti, M et al. 2004; Olefsky, JM et al. 1982]. Anschließend wird das Insulin zum Großteil in Endosomen abgebaut [Duckworth, WC, Bennett, RG and Hamel, FG 1998; Fawcett, J et al. 1993].

Auch extrazellulär erfolgt ein Abbau: als ein wichtiges Enzym ist hierbei das Insulin abbauende Enzym (insulin degrading enzyme, IDE), eine Metalloendopeptidase, zu nennen [Valera Mora, ME et al. 2003], das zudem multiple andere Funktionen in der Regulation des Zellstoffwechsels wahrnimmt [Duckworth, WC et al. 1998].

Durch die kurze Halbwertszeit des Insulins von ca. fünf Minuten [Duckworth, WC et al. 1998] gelingt es dem Körper, schnell auf die jeweilige Bedarfssituation zu reagieren.

Um das Therapieziel - die Normoglykämie - zu erreichen ist es erforderlich, die physiologische Insulinausschüttung möglichst genau imitieren zu können. Dies ist mit subkutan injiziertem Insulin jedoch nur bedingt möglich.

Zum Einen entsteht das Konzentrationsmaximum erst zwei bis drei Stunden nach Injektion und die basalen Konzentrationen werden erst wieder nach sechs bis acht Stunden erreicht [Owens, DR et al. 2001].

Zum Anderen existiert eine große Absorptionsvariabilität von bis zu 50% [Chen, JW et al. 2003]) zwischen Patienten; aber auch innerhalb desselben Individuums, wo die Variabilität bis zu 35% beträgt [Binder, C et al. 1984; Heinemann, L 2002] und unter Anderem von Insulindosis, injiziertem Volumen, Insulinkonzentration, Gebiet und Tiefe der Injektion sowie dem dortigen

Blutfluss beeinflusst wird [Galloway, JA et al. 1981]. Ebenso spielt der Grad der Insulinassoziation, also das Vorhandensein bzw. die Ratio von Mono-, Di-, und Hexameren eine große Rolle bei der Absorption vom Injektionsort [Kang, S et al. 1991], da nur Mono- und Dimere die Kapillarwand passieren können [Brange, J et al. 1988]. Folglich führt hohes Vorkommen von Hexameren zu einem längeren subkutanen Verbleib, aber auch zu erhöhter Resorptionsvariabilität.

Um die Pharmakokinetik des Insulins zu verändern, wurden in den vergangenen Jahrzehnten diverse Versuche unternommen.

Zu Beginn erfolgte die Zugabe von Protamin (Neutrales-Protamin-Hagedorn; NPH), das zu einer tetragonalen Kristallisation führt und damit einen sehr stabilen Zustand mit konsekutiv längerer Wirkdauer erreicht [Derewenda, U et al. 1989]. Eine weitere Möglichkeit bestand in Zinksuspensionen und Protamin-Zink-Insulinen [Schatz, H 2006; Sheldon, B et al. 2009]. Eine Imitation des physiologischen Insulinsekretionsprofils ist damit jedoch bei Weitem noch nicht gegeben. Die größten Annäherungen bestehen bei Kombination eines möglichst lang wirksamen mit einem sehr kurz wirksamen Insulin (multiple Injektionen im Sinne einer intensivierten konventionellen Basis-Bolus-Therapie) sowie mit einer kontinuierlichen subkutanen Applikation (Pumpentherapie), wobei die Pumpentherapie bei Typ1-Diabetikern, nicht jedoch bei Typ 2 einen Vorteil bezüglich der Blutzuckereinstellung bringt [Monami, M et al. 2009a]. Insgesamt liegt trotz aller Therapiemöglichkeiten immer noch eine Erhöhung der Blutglukose gegenüber der Normalbevölkerung vor [Rizza, RA et al. 1980], im Mittel kann ein HbA1c von 8% (=64mmol/mmol) erreicht werden.

Um hier Verbesserungen zu erzielen wurden Anfang der 90er Jahre in ihrer Aminosäuresequenz veränderte Insulinpräparate erzeugt – die Insulinanaloge oder Analoginsuline (s. Kapitel 1.3 auf Seite - 11 -).

Auch weitere Administrationsformen wie inhalatives Insulin in Pulver- bzw. Flüssigform oder gekoppelt an Technospheres (kleinste abbaubare Fumaratkügelchen) sind in Entwicklung oder in klinischer Testung [Schatz, H 2006].

Einleitung

Da die Preise der genannten Arzneimittel im Vergleich zu Humaninsulin jedoch immer noch weit höher sind, ist die Verschreibungsfähigkeit zu einem Politikum geworden. 2006 wurden beispielsweise Analoginsuline durch das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) für Typ-2-Diabetiker aus dem Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen genommen. Eine Klage durch Pharmakonzerne scheiterte im Januar 2010; seit März 2010 ist es jedoch möglich, Patienten mit hohem Risiko für Hypoglykämien - nach erfolgter, aber dennoch wirkungsloser Therapiezielanpassung - Insulin Glargin verschreiben zu können. Durch Einführung der Rabattverträge sind auch einige kurzwirksame Analoginsuline verordnungsfähig.

Wiederholt wurde auch die Verschreibungsfähigkeit für Typ-1-Diabetiker diskutiert, im Februar 2010 leitete der Gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) ein erneutes Stellungnahmeverfahren ein, bis Mai 2010 ist noch keine endgültige Entscheidung getroffen.

1.3 Insulinanaloga

Die Aminosäuren 22-26 der B-Kette (B22-26; s.a. Abb. 1 auf S. - 4 -) sind sowohl an der Dimerbildung als auch an der Interaktion mit dem Insulinrezeptor beteiligt [De Meyts, P et al. 1990], wohingegen die Entfernung der Aminosäuren B26-30 zum weitgehenden Ausbleiben der Dimerisierung der Insulinmoleküle führt [Brange, J et al. 1988; Derewenda, U et al. 1989] und die Insulinrezeptorbindung fast nicht beeinflusst [Sliker, LJ et al. 1997].

Insulin-Di- und -Monomere werden zwei- bis dreifach schneller aus dem Subkutangewebe resorbiert als hexameres Humaninsulin [Brange, J et al. 1990].

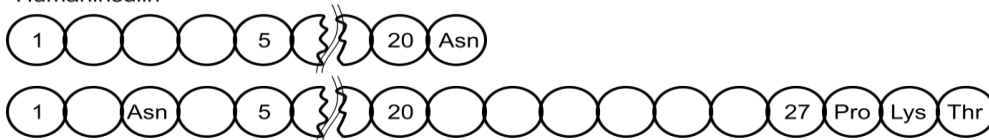
Als erste kurzwirksame Substanzen wurden Insulin Lispro und Insulin Aspart zugelassen, die durch ihren schnelleren Wirkeintritt und die kürzere Wirkdauer zu einer deutlichen Verbesserung der post-prandialen Blutglukose führten [Home, PD et al. 2000; Raskin, P et al. 2000; Vignati, L et al. 1997]. Erreicht werden konnte dies durch Weglassen und/oder Austauschen der Aminosäuren am o.g. C-Terminus der B-Kette [Brange, J 1997; Wilde, MI et al. 1997], was eine verminderte Polymerisierung zur Folge hat [Brange, J et al. 1990]. Bezüglich der langwirksamen Insulinanaloga wurde zunächst Insulin Glargin entwickelt und im Jahr 2001 zugelassen, welches durch seinen sauren pH von 4 in Folge von Verschiebung des isoelektrischen Punktes im neutralen subkutanen Fettgewebe präzipitiert und somit zu einer stark verzögerten Aufnahme führt. Dies konnte man durch Austausch des Asparagins (A21) durch Glycin und Hinzufügen von zwei Arginin-Aminosäuren an B30 erreichen. Danach folgte die Entwicklung des Insulin Detemir.

Einleitung

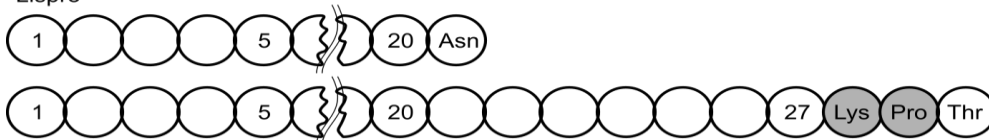
Zusammenfassend stehen derzeit folgende Präparate auf dem deutschen Markt zur Verfügung:

- Kurzwirksame Analoginsuline:
 - o Insulin Lispro (Humalog®; B28Lys-B29Pro)
 - o Insulin Aspart (NovoRapid®; B28Asp)
 - o Insulin Glulisin (Apidra®; B3Lys-B29Glu)
- Langwirksame Analoginsuline:
 - o Insulin Glargin (Lantus®; A21Gly-B31Arg-B32Arg)
 - o Insulin Detemir (Levemir®; B29Lys desB30)

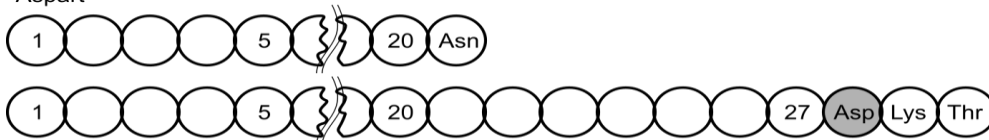
Humaninsulin



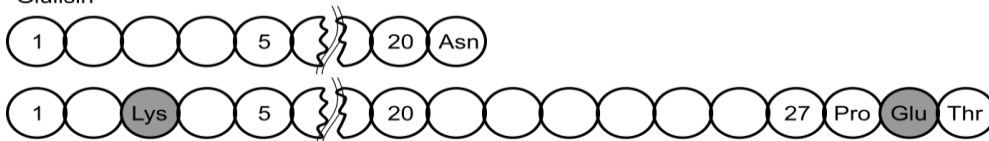
Lispro



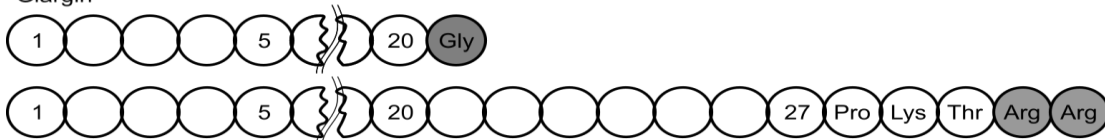
Aspart



Glulisin



Glargin



Detemir

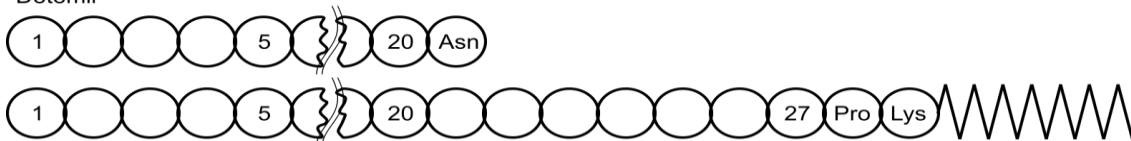


Abb. 3 AS-Sequenz der Analoga im Vergleich zu Humaninsulin; die gezackte Linie stellt die angehängte Myristinsäure dar; frei nach [Hirsch, IB 2005; Löffler, G 2007; Schatz, H 2006]

1.4 Insulin Detemir

Eine komplett andere Art, die Wirkungsverzögerung zu erreichen konnte bei Insulin Detemir, das seit 2004 in Deutschland zugelassen ist, umgesetzt werden. Hier wurde Threonin an Position B30 des Humaninsulins (vgl. auch Abb. 3 S.- 12 -) entfernt und an Lysin (B29) eine C14-Fettsäure (Myristinsäure; und somit ein hydrophober Rest) kondensiert [Havelund, S et al. 2004].

Dies ermöglicht zum Einen einen höheren Grad an Autoassoziation und zum Anderen die reversible Bindung an Albumin [Kurtzhals, P et al. 1997; Sheldon, B et al. 2009], ein im Körper interstitiell wie auch im Blutkreislauf zur Genüge vorhandenes Fettsäuretransportprotein. Nur 1-2% des Insulin Detemir liegt in freier Form vor [Kurtzhals, P et al. 1995; Markussen, J et al. 1996].

Nach subkutaner Injektion liegt Detemir zunächst in Di-Hexamer-Form vor [Whittingham, JL et al. 1997], auch diese kann eine Albuminbindung eingehen [Kurtzhals, P 2004].

Die Wirkverzögerung tritt somit an drei Orten zu Tage: erstens an der Injektionsstelle mit einer langen Halbwertszeit von 10,2 Stunden [Havelund, S et al. 2004], zweitens intravaskulär, da es Albumin-gebundenem Detemir nicht gelingt, die Kapillarwand zu passieren, und drittens durch die Albuminbindung im Interstitium.

Molekular ist bisher bekannt, dass Detemir eine 250-fach geringere mitogene Aktivität (Albumin-korrigiert 11%) und eine 50-fach niedrigere metabolische Aktivität (27% Albumin-korrigiert) hat; außerdem liegt eine geringere Affinität zum Insulin-Rezeptor (46% bzw. 18%) – und IGF-1-Rezeptor (16%) [Kurtzhals, P et al. 2000], jeweils gegenüber Humaninsulin, vor [Markussen, J et al. 1996].

Die zweifach schnellere Dissoziation vom Insulinrezeptor trägt zusätzlich zur geringeren Mitogenität bei [Kurtzhals, P et al. 2000], da neben der IGF-1-Rezeptor-Affinität [Sliker, LJ et al. 1997] auch eine langsame Dissoziationsrate vom IR zu erhöhter Mitogenität führt [Hansen, BF et al. 1996]. Immer wieder aufkeimende Sicherheitsbedenken gegenüber Insulinanaloga können somit wiederholt nicht aufrecht erhalten werden.

Zu beachten ist, dass für die gleiche blutzuckersenkende Wirkung eine vierfach so hohe molare Konzentration notwendig ist [Brunner, GA et al. 2000; Schatz, H 2006], was eventuell auf die geringere Bindung an den Insulinrezeptor, die geringere metabolische Aktivität und die erhöhte nicht Rezeptor-vermittelte Clearance zurückgeführt werden kann [Kurtzhals, P 2004; Kurtzhals, P et al. 2000].

Auch klinische Vorteile können viele genannt werden:

- die eingangs erwähnte intraindividuelle Resorptionsvariabilität bis zu 35%, die massiv die normoglykämie Diabeteseinstellung erschwert, ist bei Detemir sehr gering [Heise, T et al. 2004; Klein, O et al. 2007; Valensi, P et al. 2005];
- Detemir zeigt eine physiologischere Verteilung im Körper; durch die offenen Sinusoide der Leber liegt eine Hepatoselektivität vor [Hordern, SV et al. 2005];
- das Risiko für nächtliche Hypoglykämien ist deutlich geringer [Hermansen, K et al. 2001; Kolendorf, K et al. 2006; Vague, P et al. 2003]), u.a. da Detemir sich wie ein Puffer gegen Veränderungen der Resorptionsrate verhält [Havelund, S et al. 2004];
- bis auf eine sehr diskrete Spitze nach 4-6 Stunden existiert ein sehr flaches Wirkungsprofil [Heinemann, L et al. 1999; Heise, T et al. 2004; Plank, J et al. 2005; Vague, P et al. 2003];
- eine einmal tägliche Injektion ist bei den meisten Patienten aufgrund der langen Wirkdauer von 16-22h [Rolla, A 2008] bzw. 10-18h [Lindholm, A 2002] ausreichend [Le Floch, JP et al. 2009];
- bei zu mischenden Insulinarten ist inkomplettes Durchführen ante injectionem mit ein wesentlicher Faktor für die intraindividuelle Absorptionsvariabilität [Jehle, PM et al. 1999; Owens, DR et al. 2001], bei Detemir ist dies nicht notwendig [Lindholm, A 2002].
- bisher konnten bereits viele Studien die mindestens gleichwertige Stoffwechseleinstellung nachweisen [Home, P et al. 2004; Pieber, TR et al. 2005; Raskin, P et al. 2009].
- normalerweise kommt es unter Insulintherapie zu einem Körpergewichtsanstieg [Wing, RR et al. 1990], unter Detemir liegt jedoch

eine signifikant geringere Gewichtszunahme vor, in einigen Studien konnte sogar eine Gewichtsreduktion erreicht werden. [Bartley, PC et al. 2008; De Leeuw, I et al. 2005; Haak, T et al. 2005; Hermansen, K et al. 2004; Home, P et al. 2006; Monami, M et al. 2009b; Rosenstock, J et al. 2008].

Als große klinische Studie ist explizit auch die PREDICTIVE Studie zu nennen, die 30.000 Diabetiker unter Detemir-Therapie einschließt. Auch hier zeigen sich schon nach kurzer Beobachtungszeit von 3 Monaten die bereits oben erwähnten Vorteile [Dornhorst, A et al. 2008; Meneghini, LF et al. 2007].

Der Gewichtsvorteil von Detemir ist unter den subkutan zu applizierenden Insulinen bisher einzigartig, so dass Detemir zu Recht eine große Bedeutung in der heutigen Diabetestherapie zukommt.

Über die Ursachen dieses gewichtsparenden Effektes wurden bereits diverse Erklärungen ausgearbeitet:

Zum Einen könnte eine unterschiedliche antilipolytische Wirkung von Detemir eine Rolle spielen (wobei hier die gegenwärtige Datenlage nicht ganz eindeutig ist), zum Anderen erfolgt eine physiologischere Verteilung des Detemir (hepatisch vs. peripher). Auch eine reduzierte Nahrungsaufnahme durch weniger Hypoglykämien ist diskutiert worden [Fritsche, A et al. 2004]. Zunehmend wird der immense Einfluss auf das zentrale Nervensystem mit Auslösung eines Sättigungsgefühls im Sinne einer negativen Rückkopplung [Fajardo Montanana, C et al. 2008; Fritsche, A et al. 2004; Hallschmid, M et al.; Hermansen, K et al. 2007; Russell-Jones, D et al. 2007; Tschritter, O et al. 2007] bekannt. Dies in Zusammenschau mit einer niedrigeren Albuminkonzentration respektive einer höheren Konzentration an freiem und damit biologisch aktivem Detemir im Liquor [Tschritter, O et al. 2007] sowie dem unterschiedlichen Rezeptorbesatz ist sicher eine weitere wichtige Erklärung.

1.5 Fettzellen

Neben seiner Funktion als größte Energiereserve des menschlichen Körpers ist das Fettgewebe seit einigen Jahren auch als wichtiges endokrines "Organ" bekannt. Mittlerweile konnten zahllose sezernierte Proteine gefunden werden, die unter anderem in die Regulation der Nahrungsaufnahme (Leptin, Adiponektin), des Immunsystems (TNF- α) und vielem Anderen (Hämatopoese, Steroidproduktion, ...) eingreifen [Ahima, RS 2006; Bays, H et al. 2004; Galic, S et al.; Gregoire, FM 2001; Gregoire, FM et al. 1998; Saltiel, AR et al. 2001; Staiger, H et al. 2005b].

Fettgewebe ist eines der wichtigsten Zielgewebe des Insulins, weshalb die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente an Adipozyten untersucht wurden.

1.6 Fettzellendifferenzierung

Die Vorläuferzellen sind mesodermalen Ursprungs, die sehr häufig für in vitro Studien verwendeten Präadipozyten sind jedoch schon in die Fettzelllinie überführt, das heißt unipotent.

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens mit folgender Wachstumsarretierung und der entsprechenden Hormon-Behandlung differenzieren sie zu reifen Fettzellen mit Veränderung der Morphologie. Die zunächst fibroblast-artig erscheinenden Zellen werden sphärisch und beginnen Fetttröpfchen einzulagern. Hierzu durchlaufen sie nach der Arretierung meist postkonfluente Mitosen, die wiederum mitogene wie adipogene Signale benötigen [Cornelius, P et al. 1994; Gregoire, FM et al. 1998; Otto, TC et al. 2005; Qiu, Z et al. 2001]. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass diese für die Adipogenese nicht unbedingt notwendig sind [Qiu, Z et al. 2001; Staiger, H et al. 2005a].

Die am besten charakterisierten Zellen sind die 3T3-L1-Präadipozyten der Maus [Gregoire, FM et al. 1998; MacDougald, OA et al. 1995]. Um die Konversion der Präadipozyten in vitro zu erreichen, ist wie oben erwähnt eine chemisch definierte Behandlung notwendig; diese besteht meist neben IGF-1 und einem Glukokortikoid aus einem die cAMP-Konzentration erhöhenden Agens. Am effizientesten zeigte sich die Mischung aus Isobutyl-Methyl-Xanthin (einem cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitor), Dexamethason, Hochdosis-Insulin und FCS (fetal calf serum) [Reed, BC et al. 1980; Student, AK et al. 1980]. Da PDGF in Maus-Präadipozyten [Staiger, H et al. 2005a] im Gegensatz zur Wirkung bei humanen Präadipozyten [Hauner, H et al. 1995] anti-apoptotisch wirkt und somit auch eine Differenzierung mit niedrigeren Insulinkonzentrationen, d.h. physiologischeren, ermöglicht [Staiger, H et al. 1998] wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem PDGF eingesetzt (Details s. Material und Methoden S. - 21 -)

1.7 Fragestellung

Wie beschrieben ist Diabetes mellitus mit seinen Folgeerkrankungen ein herausragendes Problem der heutigen Gesellschaft. Mit Insulin Detemir wurde erstmals ein gentechnisch verändertes Insulin zugelassen, das unter anderen Vorteilen die erwähnte (s. S. 14/15) bisher einmalige fehlende Gewichtszunahme unter Insulintherapie aufweist. Die bisher bekannten Ursachen lassen die Wirkweise auf Zellebene, insbesondere auf Adipozyten als wichtiges Erfolgsorgan des Insulins, bisher weitestgehend außen vor, so dass das Ziel dieser Arbeit war, die Adipogenese unter Insulin Detemir in vitro im Vergleich zu Humaninsulin zu untersuchen.

2. Material und Methodik

2.1 Chemikalien

3T3-L1 (Präadipozyten)	American Type Culture Collection, Manassas, VA
Bio-Rad-Reagenz	BioRad, München
Bovine serum albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bovine serum albumin receptor grade (BSA)	Serva, Heidelberg
Dihydroxyacetonphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
Glutamin	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Insulin Detemir Levemir ®	Novo Nordisk A/S
Insuman Rapid 40 I.E./ml	Aventis Pharma, Frankfurt a. M.
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Nikotinamidadeninnukleotid (NADH)	Merck, Darmstadt
PDGF-BB	PeproTech Inc, London
PDGF-BB rHu	ProSpec-Tany TechnoGene LTD.
Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien

Material und Methodik

Triethanolamin
Trypsin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cambrex, Verviers, Belgien

β -Mercaptoethanol

Roth, Karlsruhe

2.2 Zellkultur

Wie bereits erwähnt erfolgt die Differenzierung von Präadipozyten nach festgelegten Protokollen - es sind zahlreiche bekannt [Green, H et al. 1976; Green, H et al. 1974; Gregoire, FM 2001; Gregoire, FM et al. 1998; Rosen, ED et al. 2000; Smith, PJ et al. 1988; Staiger, H et al. 1998].

In dieser Arbeit wurden 3T3-L1 Präadipozyten (American Type Culture Collection, Manassas, VA) aus Mausembryos verwendet, jeweils bis max. zur 15. Generation.

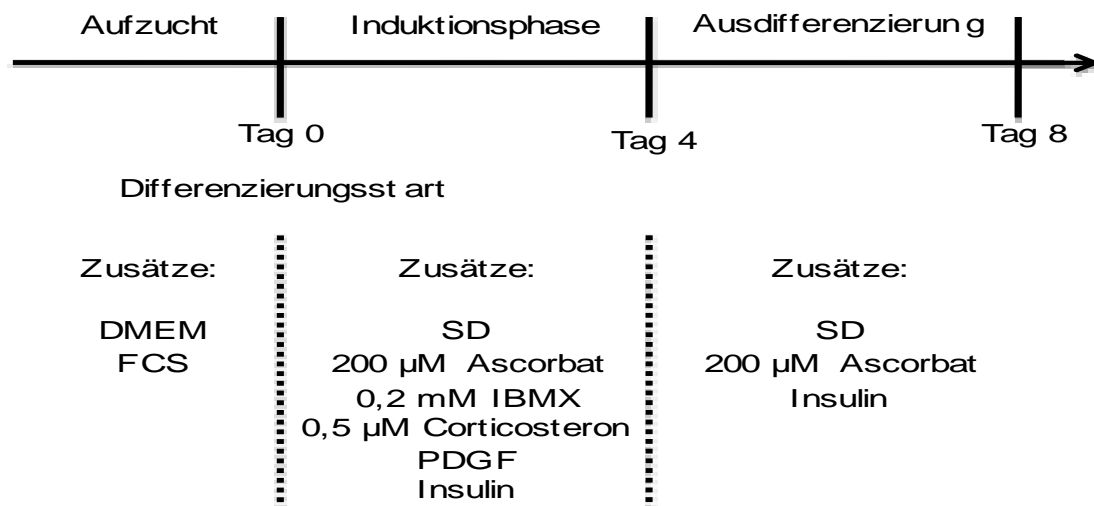


Abb. 4 Zeitstrahl des Differenzierungsprotokolls; serumhaltige Aufzucht, serumfreie Induktion und Differenzierung;

DMEM: DMEM (1g/l Glukose) + 10% FCS + 2mM Glutamin + 100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin; *SD*: DMEM/F12 (1:1) + 2mM Glutamin + 100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin + 17µM Pantothenat + 1µM Biotin + 2µg/ml apoTransferrin; *Insulin* (HI oder DET) und *PDGF* je nach Versuchsaufbau (s. dort).

Zunächst erfolgte die Aufzucht der Präadipozyten in Petrischalen (Durchmesser 10 bzw. 15 cm für die Stammkulturen) bzw. 6-Loch-Platten (für die Versuchsreihen) bis zur 100%igen Konfluenz mit DMEM/10% FCS (s.a. Abb. Abb. 4); zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz (um postkonfluente Mitosen zuzulassen) wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, um Medien und Zellüberstände zu entfernen. Es folgte die Einleitung der Differenzierung.

Da BSA die Differenzierung im Allgemeinen hemmt (s. Ergebnisse S. - 26 -), die Entwicklung einer komplett serumfreien Zellkultur jedoch nicht zufriedenstellend war (Daten nicht demonstriert), erfolgte Induktion und Differenzierung - nicht aber die Aufzucht – serumfrei, wie in Abb. 4 S. - 21 - dargestellt. Ein Medienwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Die optimalen Bedingungen wurden etabliert (s. S. - 31 -) und für die Hauptversuche angewandt.

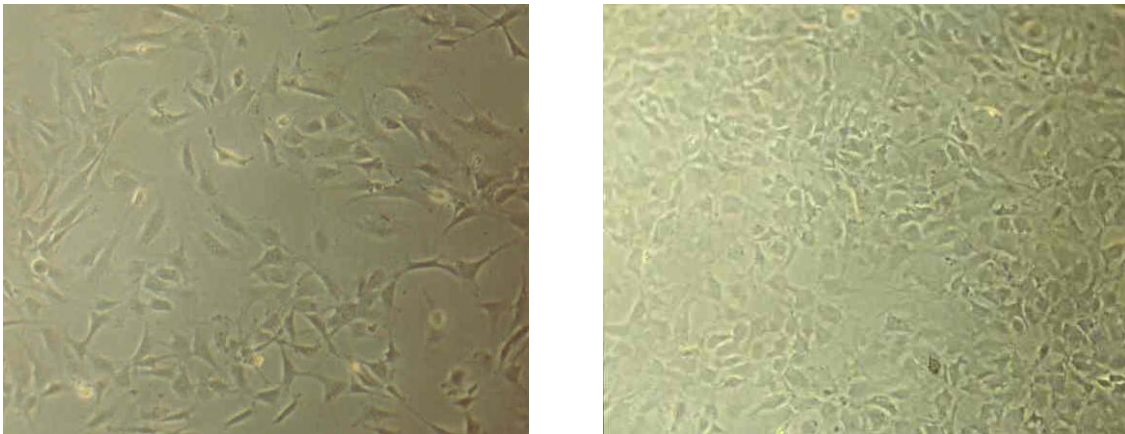


Abb. 5 Preadipozyten während der Aufzucht; links ca. 20% Konfluenz, rechts 99%; es ist deutlich der fibroblast-artige Aspekt auszumachen; Vergrößerung 125x

Um sicherzugehen, dass Detemir nicht über Bindung seines Myristinsäurerestes an die Polystyrol-Oberfläche der Kulturgefäße sequestriert wird, erfolgte eine Kontrolle mit Myristinsäure-gesättigter Kulturoberfläche wie folgt: vor der Differenzierung wurden Petrischale und Zellrasen für 2 Stunden mit SD versus SD + 1 μ M Myristinsäure inkubiert, dieser Vorgang einmal wiederholt und die Zellen anschließend in die Induktion überführt.

2.3 Zell-Lysate

Das Ernten der Zellen erfolgte nach üblichem Schema durch Abschaben des Zellrasens, nachdem dieser mit 4°C kaltem PBS gewaschen wurde und die Zellen mittels kaltem hypotonen Zellysepuffer (50mM Tris pH 7.5 + 1mM EDTA + 1mM β -Mercaptoethanol) gelöst wurden. Es erfolgte eine kurze Ultraschallbehandlung und eine Klärung der Proben für GPDH-Aktivitäts- und Protein-Bestimmungen mittels Zentrifugation (4°C; 13.000 rpm; 7 min).

2.4 Bestimmung der GPDH-Aktivität

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH), ein wichtiges Enzym im Lipid- und Glukose-Stoffwechsel dient – wie bereits früher beschrieben [Bachmeier, M et al. 1995; Pairault, J et al. 1979; Smith, PJ et al. 1988; Staiger, H et al. 1998; Wise, LS et al. 1979] – als Markerenzym für die Adipogenese; seine Aktivität wurde photometrisch bei 340nm bestimmt. Um Zellverlust als Fehlerquelle auszuschließen, wurde immer auch die spezifische GPDH-Aktivität (mU/mg Zellprotein) angegeben.

2.5 Bestimmung des zellulären Proteins

Die Proteinbestimmung erfolgte gemäß der bekannten Methode nach Bradford [Bradford, MM 1976]; die Proben wurden mit destilliertem Wasser verdünnt, parallel eine Eichreihe mit BSA (receptor grade, Serva) erstellt, jeweils mit BioRad-Test-Reagenz versetzt und nach fünf Minuten Inkubationszeit photometrisch bei 595nm gemessen. Es wurde jeweils mit Doppelwerten bzw. dem Mittelwert hieraus gearbeitet.

2.6 Öl-Rot-Färbung

Nach gering abgewandelter Vorgehensweise [Novikoff, AB et al. 1980] erfolgte die Färbung der Triglycerid-Tröpfchen mittels Öl-Rot (Oil Red O-Reagenz, Sigma-Aldrich, Deutschland). Zuvor wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4°C kaltem 10%igem Formaldehyd (in PBS) über Nacht fixiert.

Das Färbereagenz (0,5% Öl-Rot in 2-Propanol, 3:2 mit H₂O gemischt) wurde aufgetragen und 2h inkubiert. Anschließend erfolgte das erneute Waschen mit PBS sowie dauerhafte Aufbewahrung in 10%igem Formaldehyd.

2.7 Quantitative real-time-RT-PCR

Die Zelllysate wurden nach Waschen der Zellen mit PBS mittels RLT-Puffer (RLT von Qiagen + β -Mercaptoethanol) gewonnen, anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mittels RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden). Nach Behandlung mit RNase-freier DNase I wurde die isolierte RNA in cDNA (mittels AMV reverse Transkriptase und first strand cDNA kit, Roche, Mannheim) umgeschrieben.

Anschließend erfolgte die quantitative (jeweils Doppelwerte plus Positiv- und Negativkontrolle) RT-PCR mit SYBR Green 1 dye (Roche, Mannheim) am LightCycler™. Als housekeeping-Gen wurde 28S-rRNA verwendet.

Primer (TIB Mol Biol, Berlin):

PPAR γ 2: forward 5'-CTCCTGTTGACCCAGAGCAT-3'
reverse 5'-AATGCGAGTGGTCTTCCATC-3'

50 Zyklen, Annealing Temperatur 68°, 3mmol/l MgCl₂;

Leptin: forward 5'-ACATTTACACACGCGAGTCG-3'
reverse 5'-AGCATTCAGGGCTAACATCC-3'

55 Zyklen, Annealing Temperatur 69°, 5mmol/l MgCl₂;

2.8 Statistik

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Wenn nicht anders gekennzeichnet erfolgte die Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit Student's t-Test angestellt, Vergleiche zwischen mehreren Gruppen mit ANOVA (analysis of variance) und post hoc mit der Methode von Tukey-Kramer oder Dunnett (je nach Versuchsaufbau). Unterschiede in Zeitverläufen wurden mittels MANOVA (multivariate analysis of variance) untersucht. Programme: Jmp 5.0 (SAS Institute, USA) und SigmaPlot (Systat Inc., USA).

3. Ergebnisse

3.1 BSA hemmt die Fettzellendifferenzierung

Da Detemir in vivo zu ~ 95% an Albumin gebunden ist, wurde zunächst ein Versuchsaufbau mit definierter Menge Albumin (BSA; 1mg/ml) entwickelt. Hierzu wurde Humaninsulin (HI) in der für Fettzellkulturen üblichen Konzentration von 1µM mit Insulin Detemir (DET) verglichen. PDGF-Konzentration: 1nM.

Die Proteinkonzentration dient als grobes Maß für die Zelldichte bzw. Überleben der Zellen; ebenso ist sie für die Vergleichbarkeit der spezifischen GPDH-Aktivität sinnvoll (s. unten).

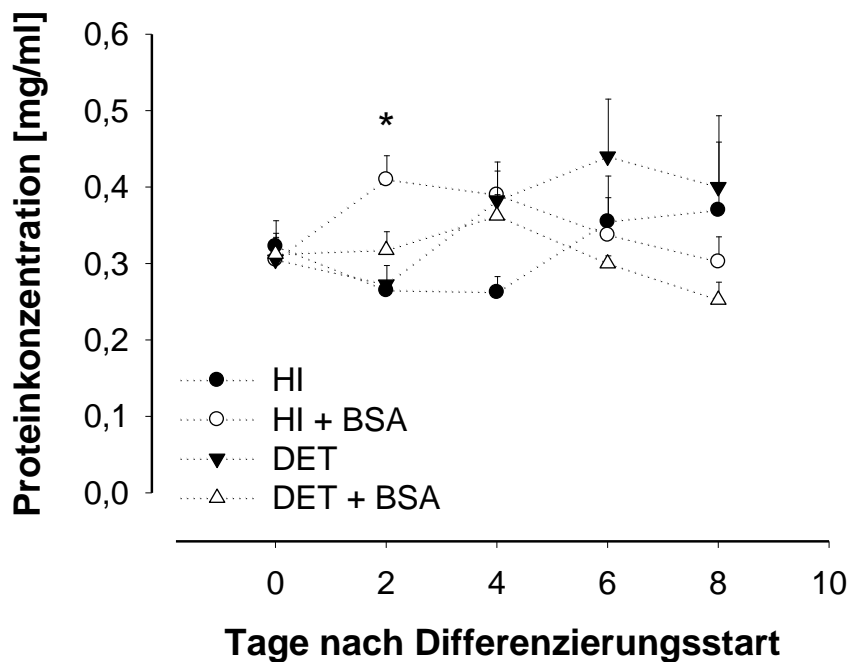


Abb. 6 Proteinkonzentration; dargestellt ist die Konzentration des Zellproteins in mg/ml unter den jeweiligen Bedingungen an den Tagen 0-8 nach Differenzierungsstart; n = 4; Signifikanz an Tag 2 mit ANOVA und Tukey's post hoc Test; * HI vs. HI + BSA

Zunächst sinkt die Proteinkonzentration an Tag 2 nach Differenzierungsstart um ca. 15% ab, jedoch nicht bei den BSA-haltigen Differenzierungsmedien. Im zeitlichen Verlauf sieht man weiterhin, dass zum Ende der Differenzierung die

Ergebnisse

Behandlung mit Insulin ohne BSA zu einem etwas erhöhten Proteingehalt beiträgt, während in den Ansätzen mit BSA die Proteinkonzentration tendenziell abnahm, auch wenn hier keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte.

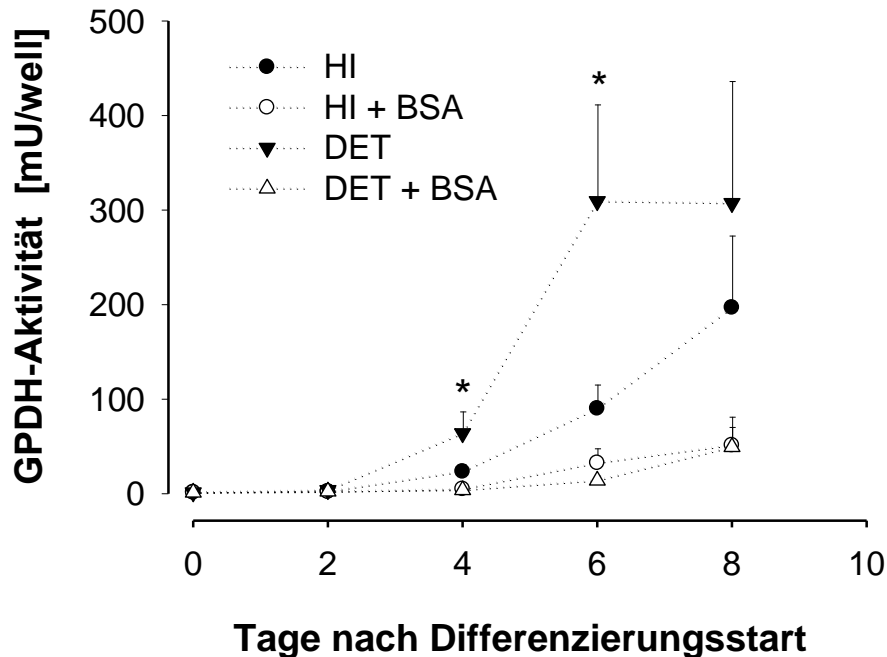


Abb. 7 GPDH-Aktivität; dargestellt ist die GPDH-Aktivität in mU/well einer 6-well-Platte unter den jeweiligen Bedingungen an den Tagen 0-8 nach Differenzierungsstart; n = 4; Signifikanz an Tag 4 und 6 mit ANOVA und Tukey's post hoc Test; * DET vs. DET + BSA

Die GPDH-Aktivität diente wie bei Methoden bereits beschrieben (s. S. - 23 -) als gängiges Maß für die Fettzeldifferenzierung, die am Tag 8 als abgeschlossen betrachtet wurde (s.a. Abb. 4 auf S.- 21 -).

DET führte zu einer beschleunigten Differenzierung, besaß also eine adipogenere Wirkung als HI.

Bei Vergleich der Insuline mit den jeweiligen BSA-haltigen Medien konnten letztere nur 16 (DET) bzw. 25% (HI) der GPDH-Werte erreichen.

Um Unterschiede zwischen den wells durch Zellverlust oder gering unterschiedliche Aussaatdichten auszugleichen, wurden die GPDH-Werte außerdem auf das Zellprotein bezogen, wie Abb. 8 zeigt.

Ergebnisse

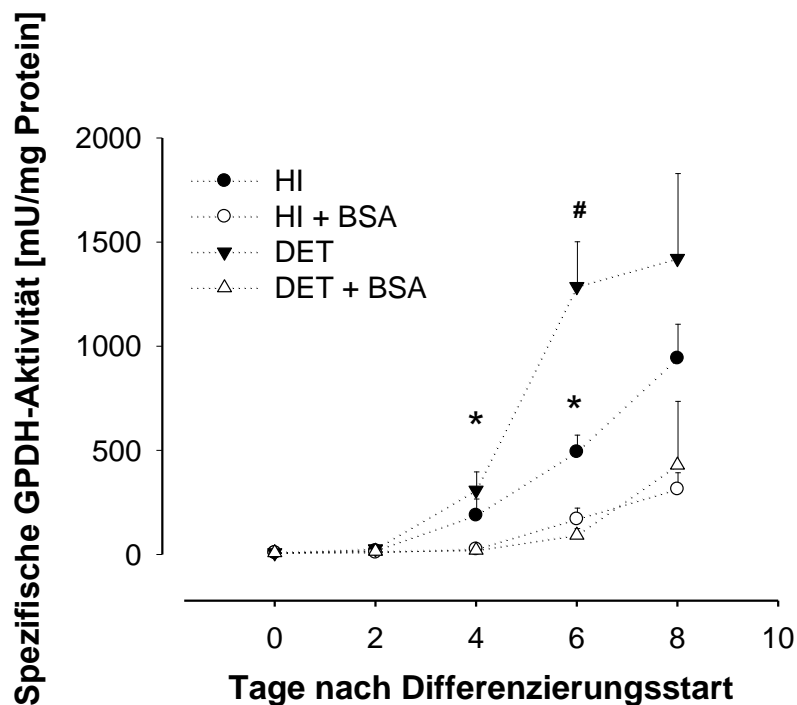


Abb. 8 spezifische GPDH-Aktivität; dargestellt in mU/mg Protein unter den jeweiligen Bedingungen an den Tagen 0-8 nach Differenzierungsstart; $n = 4$; Signifikanz an Tag 4 und 6 mit ANOVA und Tukey's post hoc Test; * DET vs. DET + BSA; # HI vs. DET

Auch hier bestätigte sich die akzelerierte Differenzierung von DET-behandelten Zellen ebenso wie der bereits oben beobachtete Effekt, dass die BSA-freien Medien eine 3- (HI) bzw. 4,5-fach (DET) höhere GPDH-Aktivität erlaubten.

Es muss also zum Einen von einer adipogeneren Wirkung von $1\mu\text{M}$ DET, zum Anderen von einer die Differenzierung hemmenden Wirkung des Albumins ausgegangen werden, weshalb alle folgenden Versuche BSA-frei unternommen wurden. Da die für Zellkulturen übliche Insulinkonzentration von $1\mu\text{M}$ weit suprphysiologisch ist, wurde eine Reduktion dieser vorgenommen, die folgende interessante Daten erbrachte.

3.2 Konzentrationsabhängige Adipogenität Detemirs

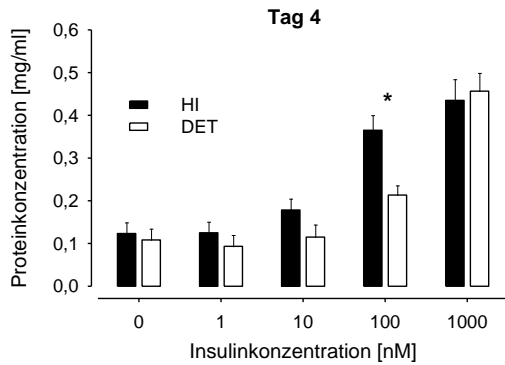


Abb. 9 Proteinkonzentration Tag 4 nach Differenzierungsstart; aufgetragen ist die je nach Insulinkonzentration verschiedene Proteinkonzentration HI vs. DET; * signifikant verschieden; $n \geq 6$; ANOVA und Dunnett's Test;

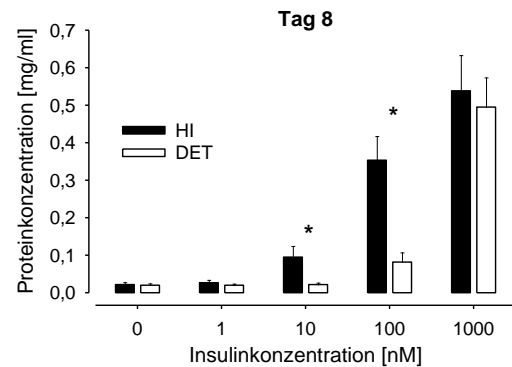


Abb. 10 Proteinkonzentration Tag 8 nach Differenzierungsstart; aufgetragen ist die je nach Insulinkonzentration verschiedene Proteinkonzentration HI vs. DET; * signifikant verschieden; $n \geq 3$; ANOVA und Dunnett's Test;

Im Vergleich sind hier jeweils die Proteinkonzentrationen unter der Differenzierung mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (von 0nM bis 1 μ M) dargestellt; auch hier beträgt die verwendete PDGF-Konzentration 1nM.

Von Tag 4 nach Differenzierungsstart bis zum Ende der Differenzierung an Tag 8 tritt außer bei der Konzentration von 1 μ M ein weiterer Zellverlust auf; im zeitlichen Verlauf erfolgte bei Humaninsulin ein angemessener Zellerhalt erst ab frühestens 10nM, bei DET erst bei über 100nM. Bei 1 μ M ist jedoch fast keine Differenz (0,53 mg/ml bei HI vs. 0,49 mg/ml bei DET) mehr auszumachen.

Abbildungen 11 und 12 zeigen die GPDH-Aktivität an den Tagen 4 und 8 nach Differenzierungsstart. Erstaunlich ist die nun geringer adipogene Wirkung des Detemir im Vergleich zu Humaninsulin bei Insulinkonzentrationen von 0-100nM. Es ergab sich ein signifikanter Differenzierungsvorteil des Humaninsulins.

Im Gegensatz hierzu zeigten sich gegenteilige Sachverhalte bei der Konzentration von 1 μ M, wie sie bereits in den Vorversuchen gefunden wurden (vgl. auch Abb. 6-8 S. - 26 -bis - 28 -).

Ergebnisse

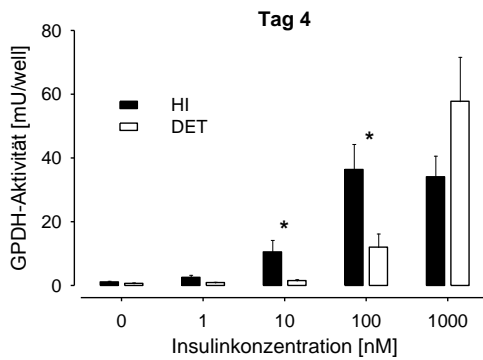


Abb. 11 GPDH-Aktivität in mU/well; Tag 4 nach Differenzierungsstart; HI vs. DET unter den jeweiligen Insulinkonzentrationen; * signifikant verschieden; $n \geq 6$; ANOVA und Dunnett's Test;

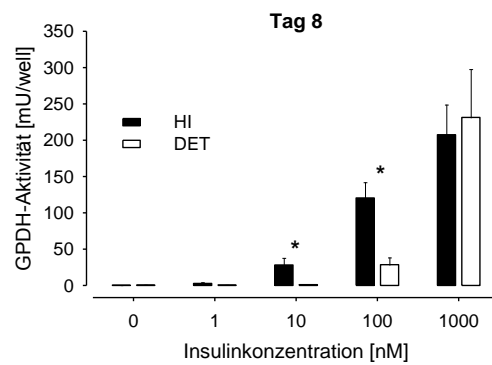


Abb. 12 GPDH-Aktivität in mU/well; Tag 8 nach Differenzierungsstart; HI vs. DET unter den jeweiligen Insulinkonzentrationen; * signifikant verschieden; $n \geq 3$; ANOVA und Dunnett's Test;

Da bei den Insulinkonzentrationen von 0-10nM wie beschrieben (s.a. Abb. 9 u. 10 auf S.- 29 -) ein erheblicher Zellverlust auftrat, sei besonders auf die spezifische GPDH-Aktivität verwiesen, die die Ergebnisse allerdings bestätigte.

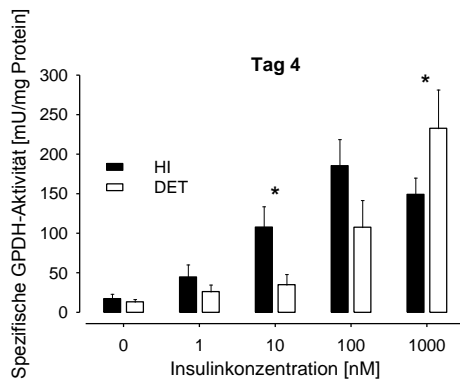


Abb. 13 Spezifische GPDH-Aktivität in mU/mg Protein; Tag 4 nach Differenzierungsstart; HI vs. DET unter den jeweiligen Insulinkonzentrationen; * signifikant verschieden; $n \geq 6$; ANOVA und Dunnett's Test;

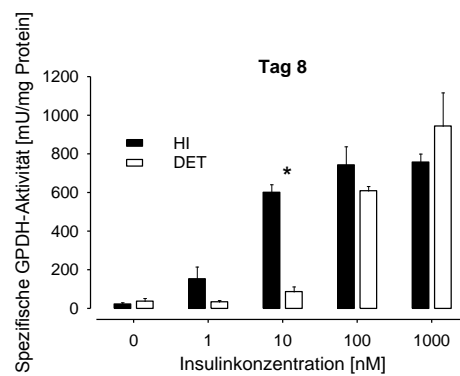


Abb. 14 Spezifische GPDH-Aktivität in mU/mg Protein; Tag 8 nach Differenzierungsstart; HI vs. DET unter den jeweiligen Insulinkonzentrationen; * signifikant verschieden; $n \geq 3$; ANOVA und Dunnett's Test;

Auch hier – bezogen auf den Proteingehalt - zeigt sich die gegenteilige Wirkung des DET auf die Differenzierung bei einer Konzentration von 1 μ M.

3.3 Etablierung eines Zellkulturprotokolls

Da mit den physiologischeren Insulinkonzentrationen aufgrund hoher Zellverluste keine ausreichende Differenzierung erreicht werden konnte (spezifische GPDH bei 1 bzw. 10nM HI nur bei 153 bzw. 601 mU/mg Protein) folgte die Etablierung eines geeigneten Differenzierungsprotokolles. Hierzu, wie auch bei allen folgenden Versuchen, wurde nun PDGF-BB der Firma ProSpec-Tany TechnoGene LTD verwendet.

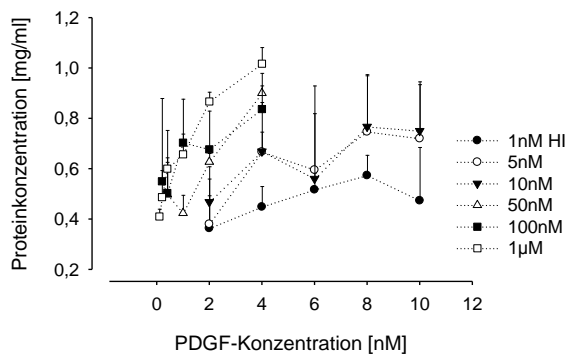


Abb. 15 Proteinkonzentration unter unterschiedlichen PDGF- und Humaninsulin-Konzentrationen; Tag 8 nach Differenzierungsstart; $n \geq 3$; weniger als 5nM HI erbrachten keine ausreichende Proteinkonzentration;

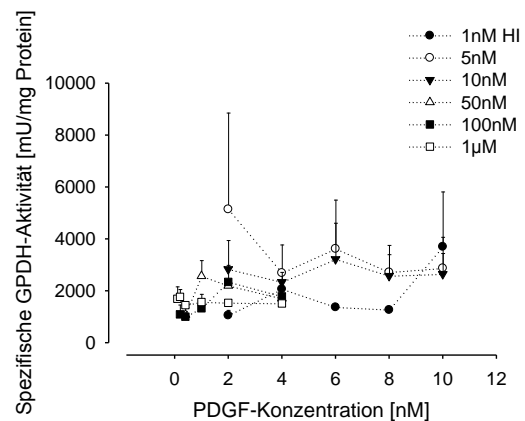


Abb. 16 Spezif. GPDH-Aktivität unter unterschiedlichen PDGF- und Humaninsulin-Konzentrationen; Tag 8 nach Differenzierungsstart; $n \geq 3$;

Aus Abb. 15 und 16 gingen mit möglichst geringer HI-Konzentration mit dennoch gesichertem Zellüberleben und einem ausreichenden und stabilen Differenzierungsergebnis folgende Bedingungen als Referenzprotokoll hervor: Humaninsulin in einer Konzentration von 5nM, PDGF in einer Konzentration von 4nM. Dies ist für alle folgenden Daten zugrunde gelegt worden.

3.4 Detemir ist weniger adipogen als Humaninsulin

Wie bereits erwähnt, benötigt DET für die gleiche metabolische Wirkung eine 4-fach höhere Konzentration, so dass in den Versuchen eine äquimolare (5nM = 208µU/ml) sowie eine äquipotente (20nM = 833µU/ml) Dosis in Vergleich zu Humaninsulin (5nM = 819µU/ml) verwendet wurde. Um auszuschließen, dass die Unterschiede durch die an DET kondensierte Myristinsäure (MY) bedingt sind, erfolgten entsprechende Myristinsäure-Kontrollen. Ethanol (EtOH), welcher als Lösungsmittel für die Myristinsäure fungierte, wurde ebenfalls kontrolliert.

3.4.1 Untersuchungen auf enzymatischer Ebene

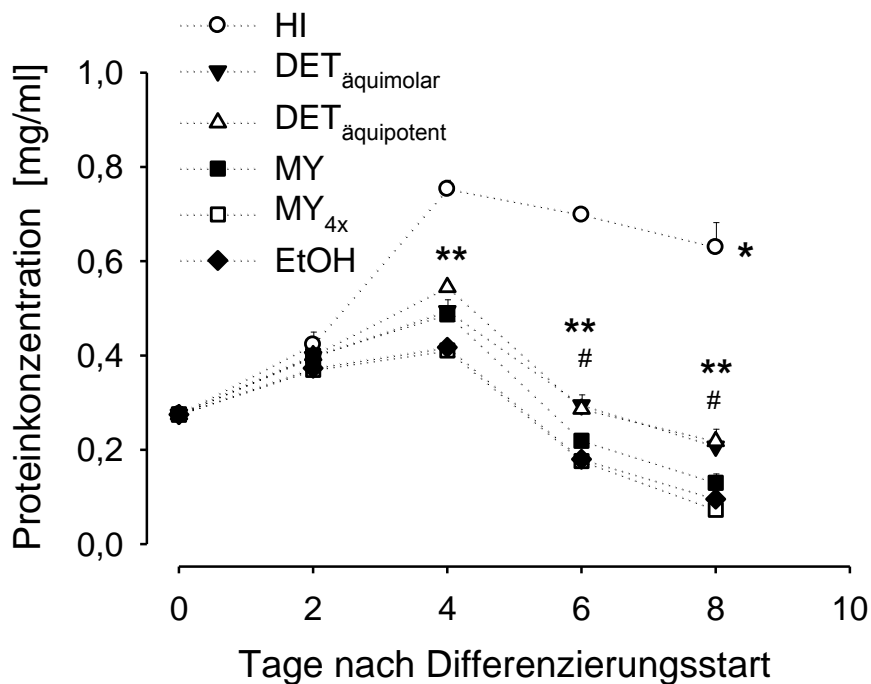


Abb. 17 Proteinkonzentration der 3T3-L1-Prädipozyten; n ≥ 3; * signifikant vs. alle (MANOVA); # DET_{äquimolar} signifikant vs. MY und EtOH, ** DET_{äquipotent} signifikant vs. MY_{4x} und EtOH an den jeweiligen Zeitpunkten (ANOVA, post hoc Dunnett's Test);

Ergebnisse

Unter Humaninsulin ist nach Differenzierungsstart zum Zeitpunkt der Induktion (Tag 0-4) ein signifikanter Proteinanstieg zu erkennen. Im Verlauf der Differenzierung kommt es allerdings nur bei Humaninsulin nicht zum massiven Proteinabfall. Weder $\text{DET}_{\text{äquimolar}}$ noch $\text{DET}_{\text{äquipotent}}$ konnten an die Daten der HI-differenzierten 3T3-L1-Zellen heranreichen, zeigten sich aber signifikant verschieden gegenüber den Kontrollen.

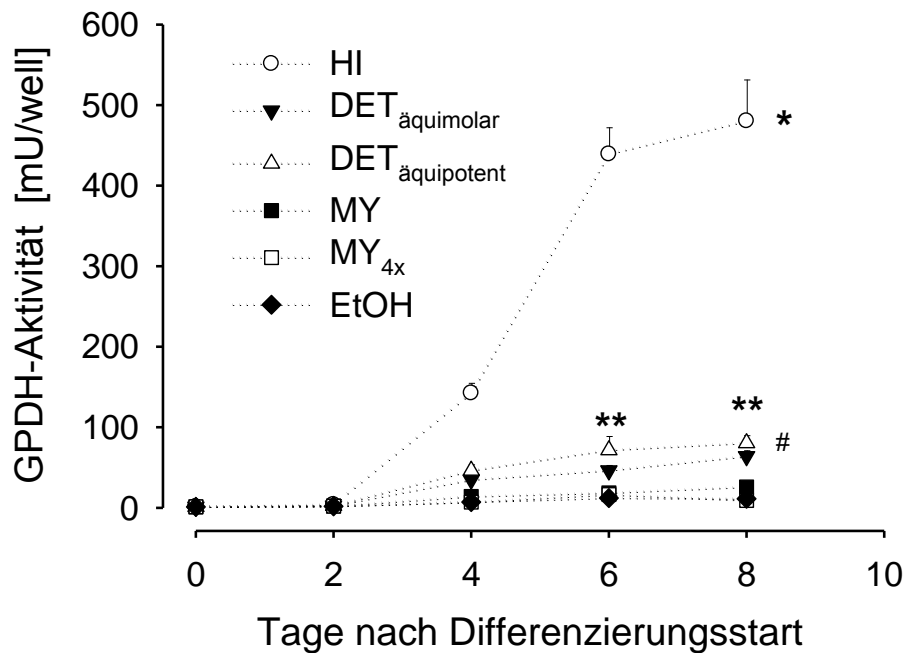


Abb. 18 GPDH-Aktivität der 3T3-L1-Prädipozyten; $n \geq 3$; * signifikant vs. alle (MANOVA); # $\text{DET}_{\text{äquipotent}}$ signifikant vs. MY_{4x} ; ** $\text{DET}_{\text{äquimolar}}$ signifikant vs. MY an den jeweiligen Zeitpunkten (ANOVA, post hoc Dunnett's Test);

Humaninsulin erreichte einen 480-fachen Anstieg der GPDH-Aktivität, die mit DET differenzierten Prädipozyten konnten nur einen ~60- ($\text{DET}_{\text{äquimolar}}$) bzw. ~80-fachen Anstieg ($\text{DET}_{\text{äquipotent}}$) erreichen. Bei DET zeigt sich außerdem eine dosisabhängige Wirkung, auch wenn hier keine Signifikanz erreicht werden konnte. Gegenüber den Kontrollen zeigte $\text{DET}_{\text{äquipotent}}$ eine signifikant höhere adipogene Wirkung, $\text{DET}_{\text{äquimolar}}$ jedoch nur an den Tagen 6 und 8 nach Differenzierungsstart.

Ergebnisse

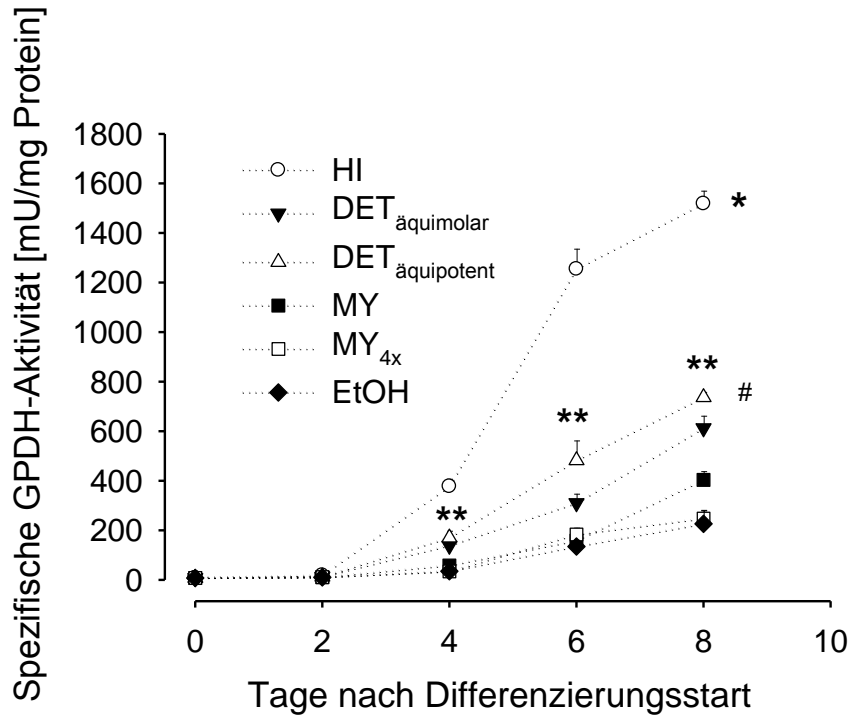


Abb. 19 Spezifische GPDH-Aktivität der 3T3-L1-Prädipozyten; $n \geq 3$; * signifikant vs. alle (MANOVA); # DET_{äquipotent} signifikant vs. MY_{4x} und EtOH; ** DET_{äquimolar} signifikant vs. MY an den jeweiligen Zeitpunkten (ANOVA, post hoc Dunnett's Test);

Auch hier bestätigten sich die vorgenannten Ergebnisse: Humaninsulin erreichte einen 200-fachen Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität, wohingegen Detemir nur einen ~80- (DET_{äquimolar}) bzw. ~100-fachen Anstieg (DET_{äquipotent}) verursachte. Ebenso zeigte sich eine signifikant verschiedene Wirkung gegenüber den Myristinsäure-Kontrollen. Ein relevanter adipogener Effekt trat dort ebenso wenig auf wie bei Ethanol.

3.4.2 Untersuchungen auf morphologischer Ebene

Die gefundenen Ergebnisse konnten auch optisch bestätigt werden. In Abb. 20 A, B, C ist deutlich die adipogenere Wirkung von Humaninsulin im Vergleich zu Detemir zu erkennen. Auch waren hier, wie aus den vorausgegangenen Daten zu erwarten gewesen war, deutlich mehr Zellen unter HI-Behandlung vorhanden.

Wiederum ist eine dosisabhängige Wirkung des DET zu beobachten.

Ergebnisse

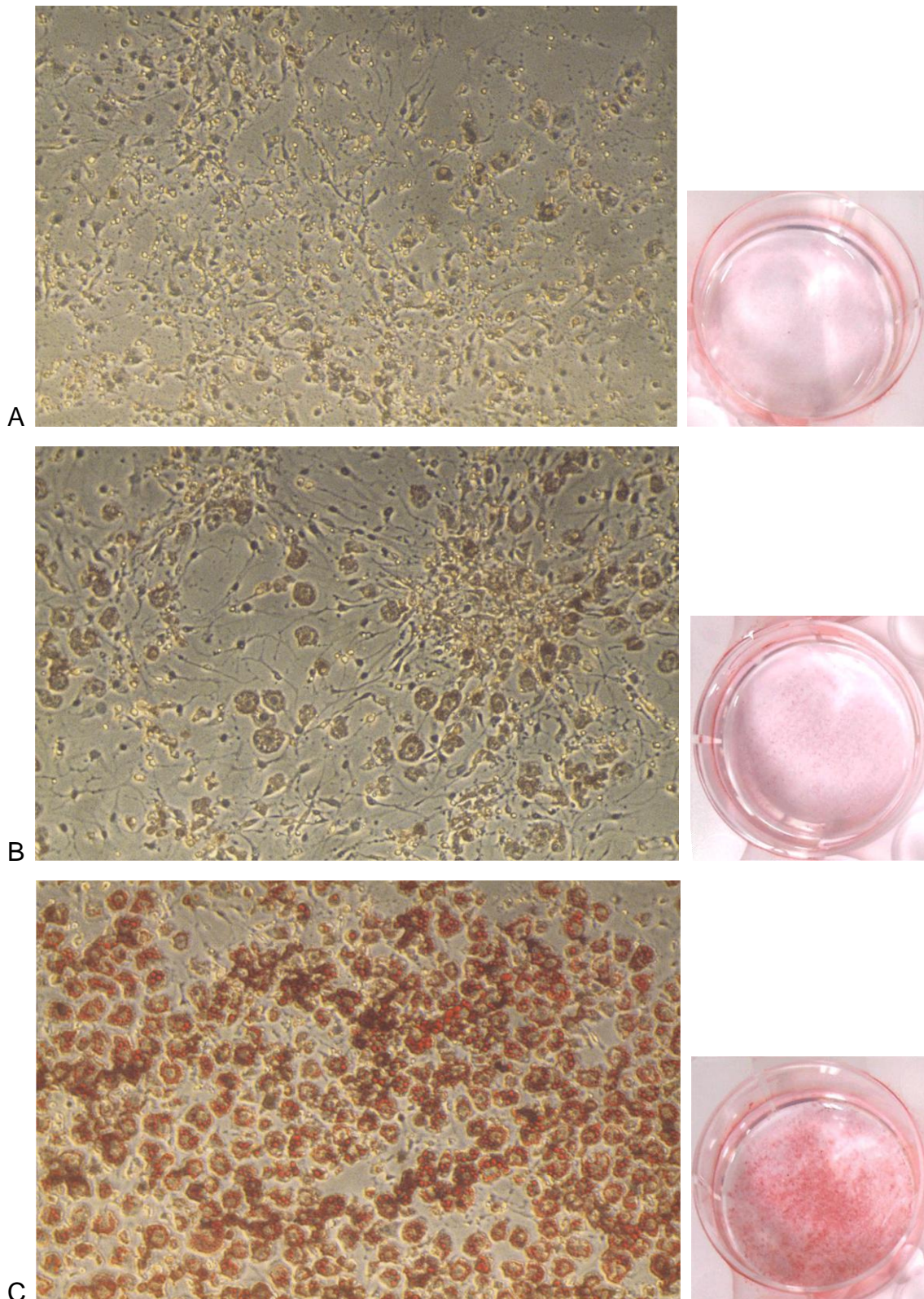


Abb. 20 A-C Mikroskopische (links; Vergrößerung 125x) und makroskopische (rechts) Ansicht der 3T3-L1 Präadipozyten-Kulturen nach abgeschlossener Differenzierung an Tag 8; die Lipid-Tröpfchen sind mit Öl-Rot angefärbt. (A) Differenzierung mit $\text{DET}_{\text{äquimolar}}$, (B) $\text{DET}_{\text{äquipotent}}$ und (C) HI.

3.4.3 Untersuchungen auf Ebene der Genexpression

Dass sich diese Beobachtungen auch bei der Genregulation bestätigten, zeigen die folgenden Daten. Der frühe Differenzierungsmarker PPAR γ 2 wurde an Tag 4 getestet.

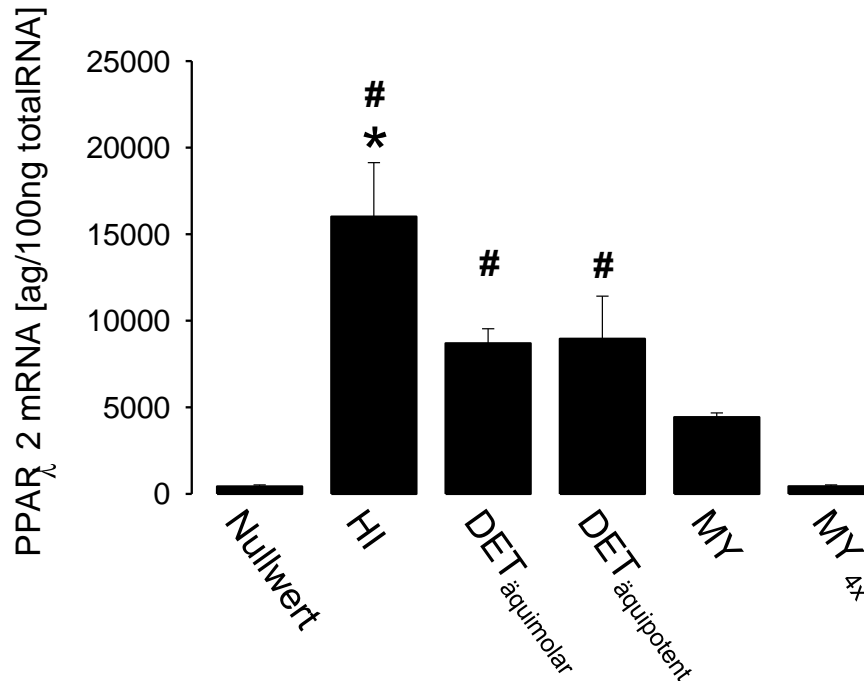


Abb. 21 PPAR γ 2-Expression an den Tagen 0 und 4 nach Differenzierungsstart; n = 3; * signifikant verschieden vs. alle, # signifikant vs. Nullwert (ANOVA und post hoc Dunnett's Test);

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Hochregulierung des Markergenes der Adipogenese durch alle Insuline. Es ergab sich jedoch ein deutlicher Vorteil des Humaninsulins gegenüber DET, sowohl in der äquimolaren als auch der äquipotenten Dosis. Diese erreichten nur knapp über 50% der Werte des Humaninsulins.

Auch der späte Differenzierungsmarker auf Genexpressionsebene (Leptin) konnte diese Ergebnisse bestätigen.

Ergebnisse

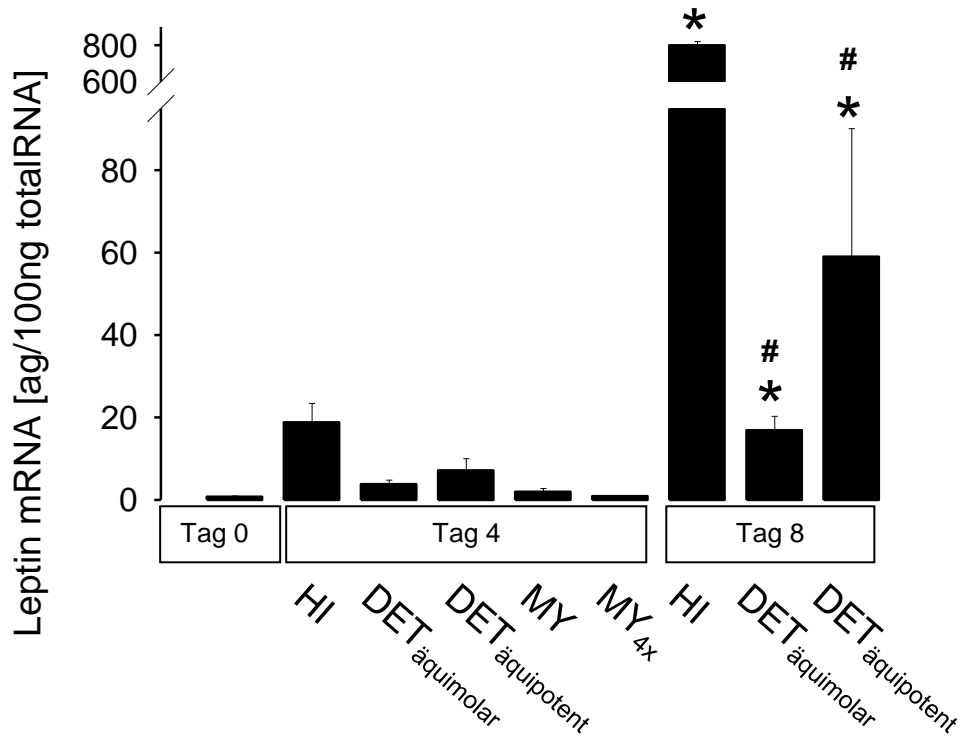


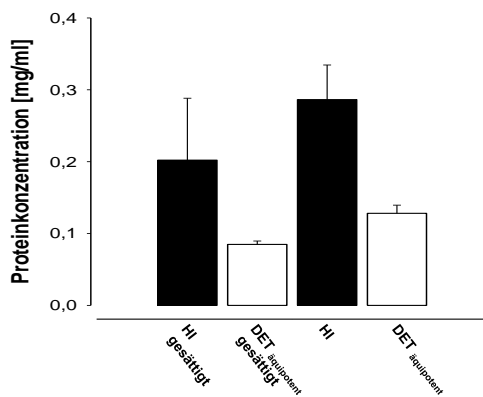
Abb. 22 Leptin-Expression an den Tagen 0, 4 und 8 nach Differenzierungsstart; n = 3; * signifikant verschieden vs. Tag 0, # signifikant vs. HI Tag 8 (ANOVA und post hoc Dunnett's Test); aufgrund Zellsterbens der mit Myristinsäure differenzierten Zellen konnte dort am Tag 8 keine RNA isoliert werden;

An Tag 4 erfolgte wie erwartet noch keine signifikante Hochregulation der Leptin-Genexpression, man erkannte jedoch bereits einen Vorteil des Humaninsulins. An Tag 8 nach Differenzierungsstart konnte aufgrund des Zellverlustes bei den Myristinsäurekontrollen nur bei den mit Insulin differenzierten Zellen RNA gewonnen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg im zeitlichen Verlauf, allerdings konnten auch hier weder DET_{äquimolar} noch DET_{äquipotent} das Niveau des HI (> 1000-facher Anstieg gegenüber Tag 0) erreichen. Es kam nur zur 22- (äquimolar) bzw. 76-fachen (äquipotent) Expressionssteigerung.

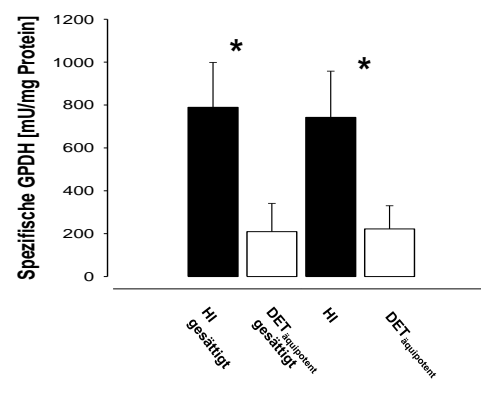
Es bestätigten sich somit auf allen drei untersuchten Ebenen (morphologisch, enzymatisch und bezüglich der Genexpression) die Ergebnisse, dass Detemir auch in äquipotenter Konzentration wesentlich geringer adipogene Eigenschaften besitzt als Humaninsulin.

Ergebnisse

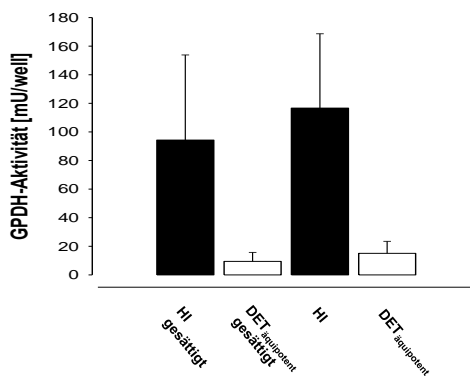
Um sicherzugehen, dass dieser eingeschränkte adipogene Effekt nicht auf Sequestrierung des Detemirs über seinen hydrophoben Myristinsäurerest zurückzuführen ist, erfolgte die Absättigung möglicher Bindungsstellen (Petrischale oder Zelloberfläche) mit Myristinsäure, wie in Material und Methodik (s. S. - 22 -) beschrieben.



A



C



B

Abb. 23 n = 3; Tag 8 nach Differenzierungsstart; dargestellt sind Proteinkonzentration (A), GPDH-Aktivität (B) und spezifische GPDH-Aktivität (C) der jeweiligen Bedingungen; * HI vs. DET jew. signifikant verschieden (gepaarter T-Test)

Zu erkennen war zum Einen eine den vorigen Ergebnissen entsprechende Differenzierung, auch hier mit der signifikant geringeren Adipogenität Detemirs. Zum Anderen war zwischen den mit Myristinsäure abgesättigten und herkömmlich differenzierten Zellen kein Unterschied auszumachen, so dass der herausgearbeitete geringer adipogene Effekt von DET nicht vom Myristat herrührt.

4. Diskussion

Diabetes mellitus mit seinen schweren Folgeerkrankungen, die stets ansteigende Prävalenz sowie die häufige Vergesellschaftung dieses Krankheitsspektrums mit dem metabolischen Syndrom inklusive der gesundheitlichen wie finanziellen Folgen für die heutige Gesellschaft machen die Bedeutung der Forschung auf diesem Gebiet klar.

Da Heilung weiterhin nicht in Sicht ist, bleibt die normoglykämie Einstellung der Diabetiker und damit möglichst Vermeidung der Krankheitsfolgen vorerst oberstes Therapieziel. In der Vergangenheit hat sich in diesem Bereich sehr viel getan. Eine große Verbesserung war z. B. die Entwicklung von Analoginsulinen, die mit Insulin Detemir und dem neuartigen Wirkverzögerungsprinzip der Albumin-Bindung zuletzt auch die - bisher unter Insulintherapie nicht vermeidbare - Gewichtszunahme beeinflussen zu können scheint.

Weil zelluläre und molekulare Ursachen bisher nicht hinreichend bekannt waren, wurde in dieser Arbeit die adipogene Wirkung des Insulin Detemir auf die Fettzelldifferenzierung untersucht.

Für in vitro Differenzierungen sind hohe Insulinkonzentrationen von $1\mu\text{M}$ Standard. Während dies in den Anfängen der Fettzelldifferenzierung als einzige Möglichkeit gesehen wurde [Smith, PJ et al. 1988], konnten angemessene Differenzierungsergebnisse in der Zwischenzeit auch mit physiologischeren Insulinkonzentrationen erzielt werden [Staiger, H et al. 2005a].

Um die in vivo bestehende Albuminbindung zu imitieren wurde zunächst ein BSA-haltiger Ansatz mit hoher Insulinkonzentration ($1\mu\text{M}$) verwendet. Hier zeigte sich jedoch eine starke Inhibition der Differenzierung unter Serumalbumin; dies war bisher nicht bekannt, stimmt allerdings gut mit aktuellen Daten überein [Schlesinger, JB et al. 2006].

Darüber hinaus konnte zudem auch ein deutlicher proadipogener sowie überlebensvermittelnder Effekt Detemirs, sowohl auf Protein- (s. Abb. 6 auf S. - 26 -) wie auch auf Enzymebene (Abb. 7+8 S. - 27 - und - 28 -) festgestellt werden.

Betrachtet man die Proteinkonzentration genauer, erkennt man den zu erwartenden Zellverlust an Tag 2 nach Induktion bei den konventionell ohne BSA differenzierten Zellen. Dieser ist auf den Entzug der Serumwachstumsfaktoren zurückzuführen. Bei den albuminhaltig differenzierten Zellen konnte dies zunächst überbrückt werden, der Zellverlust im Verlauf jedoch nicht aufgehalten, insbesondere auch keine ausreichende Differenzierung erreicht werden (s.a. Abb. 8).

Die proadipogenen Effekte Detemirs (insbes. die zeitlich beschleunigte Differenzierung, s.a. Abb. 8 S. - 28 -) überraschten allerdings und stehen in starkem Gegensatz zur Datenlage der geringeren Affinität sowie metabolischen und mitogenen Wirkung Detemirs. Auch der gewichtssparende Aspekt ist hiermit nicht in Einklang zu bringen. Durch die hohen subkutanen Konzentrationen und die längere Verweildauer an der Applikationsstelle könnte der beobachtete Effekt klinisch von Bedeutung sein; auch unter Detemir gibt es bereits Publikationen über aufgetretene Lipodystrophien [Babiker, A et al. 2010; Del Olmo, MI et al. 2008; Holstein, A et al. 2010; Levandoski, LA et al. 1982; Radermecker, RP et al. 2007; Richardson, T et al. 2003].

Aufgrund der gefundenen Differenzierungshemmung durch Albumin wurden alle folgenden Experimente ohne Serumalbumin durchgeführt.

Es folgten Versuche, die supraphysiologischen Insulinkonzentrationen zu vermeiden; die adipogenere Wirkung von DET wurde bestätigt, jedoch nur bei Verwendung von hohen Konzentrationen; bereits bei 100nM wurden genau gegenteilige Ergebnisse erhoben, DET war bei Weitem nicht in der Lage, auch nur annähernd an die Differenzierungsergebnisse des HI heranzureichen (Abb. 11-14 S. - 30 -), was sich mit den vielen klinischen Studien bezüglich der Gewichtsneutralität wesentlich besser vereinbaren ließ. Des Weiteren zeigte sich - sobald die Insulinkonzentration unter 1µM reduziert wurde - ein signifikant schlechteres Zellüberleben unter DET (s. Abb. 9+10 S. - 29 -), das auch mikroskopisch bestätigt werden konnte (vermehrt apoptotische Körperchen, wie sie für nicht ausreichend zur Differenzierung stimulierte Präadipozyten typisch

sind [Staiger, H et al. 2005a]; Daten nicht demonstriert). Es stellt sich somit die Frage, ob DET weniger zelltodsupprimierend ist als HI. Hierzu sind sicher ergänzende Untersuchungen von Nöten.

Eine mögliche Erklärung für diesen Potenz-Umsprung bei hohen Konzentrationen könnte die dem Detemir anhängende Myristinsäure sein, da Fettsäuren als Induktoren für Genexpression und Fettzellendifferenzierung bekannt sind [MacDougald, OA et al. 1995].

Insgesamt konnten mit den niedrigeren Insulinkonzentrationen jedoch auch unter Humaninsulin nicht die bestmöglichen Differenzierungsergebnisse erreicht werden (spezifische GPDH < 800mU/mg Protein), so dass zunächst ein neues Versuchsprotokoll etabliert werden musste, welches die Differenzierung unter annähernd physiologischen Insulinkonzentrationen (5nM) erlaubte (s. Kapitel 3.3 auf S. - 31 -). Hierzu musste, wie bereits früher gezeigt [Staiger, H et al. 1998], die PDGF-Konzentration im serumfreien Medium entsprechend erhöht und – um eine Differenzierungshemmung durch zu hohe Wachstumsfaktor-Konzentrationen zu vermeiden – austitriert werden.

Zu beachten ist, dass für die gleiche blutzuckersenkende Wirkung bei Detemir eine vierfach so hohe molare Konzentration notwendig ist [Brunner, GA 2000; Schatz, H 2006], was eventuell auf die geringere Bindung an den Insulinrezeptor, die geringere metabolische Aktivität und die erhöhte nicht Rezeptor-vermittelte Clearance zurückgeführt werden kann [Kurtzhals, P 2004; Kurtzhals, P et al. 2000].

Aus diesem Grund wurden sowohl eine äquimolare, sowie eine in Bezug auf die Glukose-senkende Wirkung äquipotente Konzentration Detemirs im Vergleich zu Humaninsulin getestet.

Um auszuschließen, dass die gewonnenen Ergebnisse durch den angehängten Myristinsäurerest alleine bedingt sind, erfolgten diesbezüglich Kontrollversuche, ebenso für den bei den Experimenten notwendigen Trägerstoff Ethanol.

Abb. 17-19 (s. S. - 32 - bis - 34 -) zeigten die deutlich weniger adipogene Wirkung Detemirs (äquimolar wie auch äquipotent) auf enzymatischer Ebene. Darüber hinaus erlaubt nur HI den nach Einleitung der Induktion (Tag 0-4) - und damit Entziehen der Serum-Wachstumsfaktoren - zu erwartenden initialen Proteinanstieg (s. Abb. 17) durch klonale Expansion. Weder DET äquimolar noch äquipotent oder die Myristinsäure-Kontrollen (5nM und 20nM) waren dazu in der Lage; ein erneuter Hinweis auf einen weniger überlebensvermittelnden Effekt Detemirs.

Auf morphologischer Ebene konnten die Daten ebenso eindrücklich bestätigt werden (s. Fotos s. - 36 -). Neben der verminderten Adipogenität drängte sich außerdem auch die Vermutung einer verminderten Lipogenität auf. Dies ist jedoch ein optischer Eindruck und muss durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Während der Differenzierung von Fettzellen wird die Expression von über 2000 Genen reguliert [Guo, X et al. 2000]. Leptin (als spät im Verlauf hochreguliertes Gen [Gregoire, FM 2001; Simons, PJ et al. 2005]) und der relativ adipozytenspezifische frühe Differenzierungsmarker und Transkriptionsfaktor PPAR γ 2 [Braissant, O et al. 1996; Saladin, R et al. 1999; Tontonoz, P et al. 1994] dienten als Messgrößen. Von PPAR γ ist bekannt, dass sein Maximum am Tag 3-4 der Differenzierung [Cornelius, P et al. 1994] eintritt, weshalb er für die Zwischenergebnisse an Tag 4 ausgezeichnet in Frage kam.

Alle Insuline konnten die signifikant vermehrte Expression der besagten Gene hervorrufen, DET_{äquimolar} wie auch DET_{äquipotent} erreichten jedoch bei Weitem nicht das Niveau des Humaninsulins.

Zusammenfassend konnte auf allen drei untersuchten Ebenen (morphologisch, enzymatisch und bezüglich der Genexpression) die Schlussfolgerung, dass Insulin Detemir auch in äquipotenter Dosis im Vergleich zu Humaninsulin deutlich weniger adipogen ist, bestätigt werden. Um sicherzugehen, dass der Effekt nicht durch eine Bindung des Myristinsäure-Restes an Rezeptor- (und damit Wirkungsort) -fremde Stellen hervorgerufen ist, erfolgte abschließend

eine der Differenzierung vorausgegangene Absättigung aller möglichen Bindungsstellen.

Die gefundenen Ergebnisse stehen im Einklang mit der bereits bekannten geringeren Rezeptoraffinität sowie der niedrigeren mitogenen wie metabolischen Wirkung des Detemir.

Für den beschriebenen Gewichtsvorteil stellen diese Daten eine weitere Erklärung dar. Die bisher bekannten Theorien (s. S. 14/15), die von Verteilungsunterschieden bis zu ZNS-gesteuerten Veränderungen der Nahrungsaufnahme und körperlichen Aktivität reichen, müssen nun um die molekulare Ebene ergänzt werden.

PPAR γ als wichtiger Regulator des lipo- und adipogenen Differenzierungsprogramms führt unter Aktivierung durch Agonisten (z.B. die orale Antidiabetika-Gruppe der Glitazone) zur Gewichtszunahme; diese ist jedoch bis zu 75% durch vermehrten Wasseranteil im Körper bedingt [Basu, A et al. 2006; Packianathan, IC et al. 2005]; ein möglicher Hinweis, dass die geringere Gewichtszunahme unter Detemir einer geringeren Ödembildung durch weniger PPAR-Aktivierung zuzuordnen sein könnte. Untersuchungen zu Körperbestandteilen unter Detemirtherapie sind bis heute jedoch nicht erfolgt.

Des Weiteren hängt die Differenzierung von Präadipozyten von den verwendeten Fettkompartimenten ab. Während subkutane Präadipozyten unter Glitazonen wie erwartet vermehrt differenzierten, zeigten sich viszerale Fettzellen trotz ähnlicher PPAR-Expression resistent [Adams, M et al. 1997], so dass es zu einer Umverteilung der Adipositas vom viszeralen zum subkutanen Depot [Carey, DG et al. 2002; Laplante, M et al. 2006; Miyazaki, Y et al. 2002; Virtanen, KA et al. 2003] kommt. Viszerale Adipositas spielt als eigenständiger Risikofaktor und Prädiktor für Insulinresistenz eine große Rolle [Albu, JB et al. 2000; Bonora, E et al. 1992; Despres, JP et al. 1995; Goodpaster, BH et al. 1997; Kissebah, AH et al. 1989; Wajchenberg, BL et al. 2002]. Ob Detemir in beiden Fettentitäten reduzierte PPAR γ -Expression aufweist und ob sich dies wiederum in veränderter Kompartimentverteilung sowie Unterschieden in den jeweiligen Differenzierungsprogrammen widerspiegelt, bleibt zu erforschen.

Diskussion

Unbedingt sind auch Adipo- und Zytokine als weitere Ursachen der Gewichtsneutralität Detemirs zu diskutieren. Dass sie in die Adipogenese und den Lipidmetabolismus erheblich eingreifen, steht außer Frage [Fu, Y et al. 2005; Hauner, H et al. 1994; Hauner, H et al. 1995; Lara-Castro, C et al. 2007; Liang, X et al. 2006; Machinal-Quelin, F et al. 2002; Path, G et al. 2001; Petruschke, T et al. 1993; Petruschke, T et al. 1994; Sopasakis, VR et al. 2004; Torti, FM et al. 1989]. Interessant wäre, inwieweit Detemir eine Sekretionsänderung dieser Hormone hervorruft.

Abschließend muss jedoch die begrenzte Übertragungsfähigkeit eines Zellsystems auf die in vivo-Situation beachtet werden. Auch die hier gefundenen Daten können natürlich nur begrenzt transferiert werden, insbesondere da Detemir im Körper ja bekanntermaßen zu 99% Albumin-gebunden ist, die hier vorliegenden Daten jedoch unter serumfreien Bedingungen erhoben wurden. Da allerdings nur das freie DET das biologisch aktive Kompartiment darstellt, werden die Ergebnisse dadurch keinesfalls abgeschwächt.

5. Zusammenfassung

Bis zum heutigen Tage ist eine Heilung der Volkskrankheit Diabetes nicht möglich. Um die zur Vermeidung der Folgeschäden notwendige normnahe Blutglukose zu erreichen, werden immer neue Anstrengungen unternommen, eine möglichst physiologische Insulinzufuhr zu imitieren.

Insulin Detemir mit seinem langen Wirkprofil konnte dies durch die Albuminbindung nahezu erreichen; zugrunde liegt der angehängte Myristinsäure-Rest. In vielen Studien konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass Detemir – im Vergleich zur Situation bei herkömmlichen Insulin - keinen Gewichtsanstieg hervorruft. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Insulin Detemir auf das wichtige Erfolgsorgan Fettgewebe anhand der Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten untersucht.

Getestet wurde jeweils im Vergleich zu Humaninsulin, untersucht wurden drei Ebenen. Die enzymatische Ebene mit der photometrisch bestimmten GPDH-Aktivität als Marker der Differenzierung; die morphologische mittels mikroskopischer Ansicht nach Färbung der Fetttröpfchen, sowie die Ebene der Genexpression, da während der Adipogenese mehr als 2000 Gene in ihrer Expression verändert werden; in der vorliegenden Arbeit wurden PPAR γ 2 und Leptin als Differenzierungsmarker mittels Polymerase-Ketten-Reaktion quantifiziert.

Da sich in den ersten Experimenten eine starke Differenzierungshemmung durch Serumalbumin zeigte, mussten alle Versuche in Abwesenheit von Albumin stattfinden.

Bei supraphysiologischen Konzentrationen trat eine signifikant höhere Adipogenität des DET auf, was im Gegensatz zur Literatur und zur beobachteten Gewichtsneutralität steht. Ursächlich hierfür könnte die Wirkung des Fettsäurerestes bei hohen Konzentrationen sein.

Ziel war es daher, die Untersuchungen mit möglichst physiologischen Insulinkonzentrationen durchführen zu können, so dass ein geeignetes Versuchsprotokoll etabliert wurde. Da für die gleiche blutzuckersenkende

Zusammenfassung

Wirkung eine 4-fach molare Konzentration an Detemir benötigt wird, wurden die Ergebnisse im äquimolaren, sowie im äquipotenten Bereich gewonnen.

Hier zeigte sich eine wesentlich weniger adipogene Wirkung des Insulin Detemir im Vergleich zu Humaninsulin, was auf allen drei untersuchten Ebenen deutlich gezeigt werden konnte; weder Detemir äquimolar noch äquipotent waren in der Lage, an die Adipogenität des Humaninsulins heranzureichen; dass dies am Myristinsäure-Rest liegt, wurde in entsprechenden Kontrollen ausgeschlossen.

Des Weiteren kann aufgrund der Proteinverläufe ein geringerer mitogener/zelltodsupprimierender Effekt von Detemir angenommen werden, da nur unter Humaninsulin postkonfluente Mitosen beobachtet werden konnten. Hierzu sind jedoch weitere bestätigende Untersuchungen von Nöten. Auch die morphologisch vermutete weniger lipogene Wirkung wirft neue interessante Fragestellungen auf.

Schließlich können die gewonnen Ergebnisse der geringeren Adipogenität Detemirs eine weitere gute Erklärung zum gewichtsneutralen Verhalten des Insulins darstellen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DET	Insulin Detemir = Levemir®
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECACC	European Collection of Cell Cultures
FCS	fetal calf serum
FS	Fettsäure
HI	Humaninsulin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MY	Myristinsäure
NPH	Neutrales Protamin Hagedorn (Verzögerungsinsulin)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
SEM	standard error of the mean
SD	serumfreies Differenzierungsmedium

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Primärstruktur des Humaninsulins	- 4 -
Abb. 2 Ausschnitte aus der Insulinsignaltransduktion	- 6 -
Abb. 3 AS-Sequenz der Analoga im Vergleich zu Humaninsulin.....	- 12 -
Abb. 4 Zeitstrahl des Differenzierungsprotokolls	- 21 -
Abb. 5 Präadipozyten während der Aufzucht	- 22 -
Abb. 6 Proteinkonzentration unter BSA.....	- 26 -
Abb. 7 GPDH-Aktivität unter BSA.....	- 27 -
Abb. 8 spezifische GPDH-Aktivität unter BSA	- 28 -
Abb. 9 Proteinkonzentration Tag 4, Konzentrationsabhängigkeit.....	- 29 -
Abb. 10 Proteinkonzentration Tag 8, Konzentrationsabhängigkeit	- 29 -
Abb. 11 GPDH-Aktivität Tag 4, Konzentrationsabhängigkeit.....	- 30 -
Abb. 12 GPDH-Aktivität Tag 8, Konzentrationsabhängigkeit.....	- 30 -
Abb. 13 Spezifische GPDH-Aktivität Tag 4, Konzentrationsabhängigkeit ...	- 30 -
Abb. 14 Spezifische GPDH-Aktivität Tag 8, Konzentrationsabhängigkeit	- 30 -
Abb. 15 Proteinkonzentration; Protokolletablierung Tag 8	- 31 -
Abb. 16 Spezif. GPDH-Aktivität; Protokolletablierung Tag 8	- 31 -
Abb. 17 Enzymebene; Proteinkonzentration	- 32 -
Abb. 18 Enzymebene; GPDH-Aktivität	- 33 -
Abb. 19 Enzymebene; Spezifische GPDH-Aktivität.....	- 34 -
Abb. 20 A-C Morphologie.	- 36 -
Abb. 21 Genexpression; PPAR γ 2-Expression Tag 0 und 4	- 37 -
Abb. 22 Genexpression; Leptin-Expression am Tag 0 und 4	- 38 -
Abb. 23 A-C Myristinsäurekontrolle	- 39 -

8. Literaturverzeichnis

- Adams, M, Montague, CT, Prins, JB, Holder, JC, Smith, SA, Sanders, L, Digby, JE, Sewter, CP, Lazar, MA, Chatterjee, VKO'Rahilly, S (1997). "Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation." J Clin Invest **100**(12): 3149-53.
- Ahima, RS (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 242S-249S.
- Albu, JB, Kovera, AJJohnson, JA (2000). "Fat distribution and health in obesity." Ann N Y Acad Sci **904**: 491-501.
- AmericanDiabetesAssociation (2008). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **31 Suppl 1**: S55-60.
- Babiker, ADatta, V (2010). "Lipoatrophy with insulin analogues in type I diabetes." Arch Dis Child.
- Bachmeier, MLoffler, G (1995). "Influence of growth factors on growth and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in serum-free conditions." Eur J Cell Biol **68**(3): 323-9.
- Ballotti, R, Le Marchand-Brustel, Y, Gammeltoft, SVan Obberghen, E (1989). "Insulin receptor: tyrosine kinase activity and insulin action." Reprod Nutr Dev **29**(6): 653-61.
- Barnett, AH, Eff, C, Leslie, RDPyke, DA (1981). "Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs." Diabetologia **20**(2): 87-93.
- Bartley, PC, Bogoev, M, Larsen, JPhilotheou, A (2008). "Long-term efficacy and safety of insulin detemir compared to Neutral Protamine Hagedorn insulin in patients with Type 1 diabetes using a treat-to-target basal-bolus regimen with insulin aspart at meals: a 2-year, randomized, controlled trial." Diabet Med **25**(4): 442-9.
- Basu, A, Jensen, MD, McCann, F, Mukhopadhyay, D, Joyner, MJRizza, RA (2006). "Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes." Diabetes Care **29**(3): 510-4.
- Bays, H, Mandarino, LDeFronzo, RA (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach." J Clin Endocrinol Metab **89**(2): 463-78.
- Binder, C, Lauritzen, T, Faber, OPramming, S (1984). "Insulin pharmacokinetics." Diabetes Care **7**(2): 188-99.
- Blundell, TL, Cutfield, JF, Dodson, EJ, Dodson, GG, Hodgkin, DCMercola, DA (1972). "The crystal structure of rhombohedral 2 zinc insulin." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **36**: 233-41.
- Bonora, E, Del Prato, S, Bonadonna, RC, Gulli, G, Solini, A, Shank, ML, Ghiatas, AA, Lancaster, JL, Kilcoyne, RF, Alyassin, AMet al. (1992). "Total body fat content and fat topography are associated differently with in vivo glucose metabolism in nonobese and obese nondiabetic women." Diabetes **41**(9): 1151-9.

- Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braissant, O, Foufelle, F, Scotto, C, Dauca, MWahli, W (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." Endocrinology **137**(1): 354-66.
- Brange, J (1997). "The new era of biotech insulin analogues." Diabetologia **40 Suppl 2**: S48-53.
- Brange, JLangkjoer, L (1993). "Insulin structure and stability." Pharm Biotechnol **5**: 315-50.
- Brange, J, Owens, DR, Kang, SVolund, A (1990). "Monomeric insulins and their experimental and clinical implications." Diabetes Care **13**(9): 923-54.
- Brange, J, Ribel, U, Hansen, JF, Dodson, G, Hansen, MT, Havelund, S, Melberg, SG, Norris, F, Norris, K, Snel, Let al. (1988). "Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications." Nature **333**(6174): 679-82.
- Brunner, GA, Sendhofer, G, Wutte, A, Ellmerer, M, Sogaard, B, Siebenhofer, A, Hirschberger, S, Krejs, GJPieber, TR (2000). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of long-acting insulin analogue NN304 in comparison to NPH insulin in humans." Exp Clin Endocrinol Diabetes **108**(2): 100-5.
- Capeau, J (2005). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **21 Spec No**: 34-9.
- Carey, DG, Cowin, GJ, Galloway, GJ, Jones, NP, Richards, JC, Biswas, NDoddrell, DM (2002). "Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [corrected]." Obes Res **10**(10): 1008-15.
- Chen, JW, Christiansen, JSLauritzen, T (2003). "Limitations to subcutaneous insulin administration in type 1 diabetes." Diabetes Obes Metab **5**(4): 223-33.
- Choi, KKim, YB (2010). "Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." Korean J Intern Med **25**(2): 119-29.
- Cornelius, P, MacDougald, OALane, MD (1994). "Regulation of adipocyte development." Annu Rev Nutr **14**: 99-129.
- Creutzfeldt, W (1979). "The incretin concept today." Diabetologia **16**(2): 75-85.
- DCCT (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." N Engl J Med **329**(14): 977-86.
- De Leeuw, I, Vague, P, Selam, JL, Skeie, S, Lang, H, Draeger, EEIte, JW (2005). "Insulin detemir used in basal-bolus therapy in people with type 1 diabetes is associated with a lower risk of nocturnal hypoglycaemia and less weight gain over 12 months in comparison to NPH insulin." Diabetes Obes Metab **7**(1): 73-82.
- De Meyts, P (2004). "Insulin and its receptor: structure, function and evolution." Bioessays **26**(12): 1351-62.

- De Meyts, P, Gu, JL, Shymko, RM, Kaplan, BE, Bell, GIWhittaker, J (1990). "Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene." Mol Endocrinol **4**(3): 409-16.
- Del Olmo, MI, Campos, V, Abellan, P, Merino-Torres, JFPinon, F (2008). "A case of lipoatrophy with insulin detemir." Diabetes Res Clin Pract **80**(1): e20-1.
- Derewenda, U, Derewenda, Z, Dodson, GG, Hubbard, REKorber, F (1989). "Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly." Br Med Bull **45**(1): 4-18.
- Despres, JP, Lemieux, S, Lamarche, B, Prud'homme, D, Moorjani, S, Brun, LD, Gagne, CLupien, PJ (1995). "The insulin resistance-dyslipidemic syndrome: contribution of visceral obesity and therapeutic implications." Int J Obes Relat Metab Disord **19 Suppl 1**: S76-86.
- Dornhorst, A, Luddeke, HJ, Sreenan, S, Kozlovski, P, Hansen, JB, Looij, BJMeneghini, L (2008). "Insulin detemir improves glycaemic control without weight gain in insulin-naive patients with type 2 diabetes: subgroup analysis from the PREDICTIVE study." Int J Clin Pract **62**(4): 659-65.
- Duckworth, WC, Bennett, RGHamel, FG (1998). "Insulin degradation: progress and potential." Endocr Rev **19**(5): 608-24.
- Dunn, MF (2005). "Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review." Biometals **18**(4): 295-303.
- Emdin, SO, Dodson, GG, Cutfield, JMCutfield, SM (1980). "Role of zinc in insulin biosynthesis. Some possible zinc-insulin interactions in the pancreatic B-cell." Diabetologia **19**(3): 174-82.
- Fajardo Montanana, C, Hernandez Herrero, CRivas Fernandez, M (2008). "Less weight gain and hypoglycaemia with once-daily insulin detemir than NPH insulin in intensification of insulin therapy in overweight Type 2 diabetes patients: the PREDICTIVE BMI clinical trial." Diabet Med **25**(8): 916-23.
- Fawcett, JRabkin, R (1993). "Degradation of insulin by isolated rat renal cortical endosomes." Endocrinology **133**(4): 1539-47.
- Foti, M, Moukil, MA, Dudognon, PCarpentier, JL (2004). "Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signalling." Novartis Found Symp **262**: 125-41; discussion 141-7, 265-8.
- Fritsche, AHaring, H (2004). "At last, a weight neutral insulin?" Int J Obes Relat Metab Disord **28 Suppl 2**: S41-6.
- Fu, Y, Luo, N, Klein, RLGarvey, WT (2005). "Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation." J Lipid Res **46**(7): 1369-79.
- Galic, S, Oakhill, JSSteinberg, GR "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 129-39.
- Galloway, JA, Spradlin, CT, Nelson, RL, Wentworth, SM, Davidson, JASwarner, JL (1981). "Factors influencing the absorption, serum insulin concentration, and blood glucose responses after injections of regular insulin and various insulin mixtures." Diabetes Care **4**(3): 366-76.
- Gallwitz, B (2010). "Benefit-risk assessment of exenatide in the therapy of type 2 diabetes mellitus." Drug Saf **33**(2): 87-100.

- Goodpaster, BH, Thaete, FL, Simoneau, JAKelley, DE (1997). "Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat." Diabetes **46**(10): 1579-85.
- Green, HKehinde, O (1976). "Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells." Cell **7**(1): 105-13.
- Green, HMeuth, M (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." Cell **3**(2): 127-33.
- Gregoire, FM (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 997-1002.
- Gregoire, FM, Smas, CMSul, HS (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.
- Guo, XLiao, K (2000). "Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation." Gene **251**(1): 45-53.
- Haak, T, Tiengo, A, Draeger, E, Suntum, MWaldhausl, W (2005). "Lower within-subject variability of fasting blood glucose and reduced weight gain with insulin detemir compared to NPH insulin in patients with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **7**(1): 56-64.
- Hallschmid, M, Jauch-Chara, K, Korn, O, Molle, M, Rasch, B, Born, J, Schultes, BKern, W "Euglycemic infusion of insulin detemir compared with human insulin appears to increase direct current brain potential response and reduces food intake while inducing similar systemic effects." Diabetes **59**(4): 1101-7.
- Hansen, BF, Danielsen, GM, Drejer, K, Sorensen, AR, Wiberg, FC, Klein, HHLundemose, AG (1996). "Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency." Biochem J **315** (Pt 1): 271-9.
- Hauner, H (2006). "[The costs of diabetes mellitus and its complications in Germany]." Dtsch Med Wochenschr **131** **Suppl 8**: S240-2.
- Hauner, H, Koster, Ivon Ferber, L (2003). "[Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse]." Dtsch Med Wochenschr **128**(50): 2632-7.
- Hauner, H, Petruschke, TGries, FA (1994). "Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells." Metabolism **43**(2): 227-32.
- Hauner, H, Rohrig, KPetruschke, T (1995). "Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function." Eur J Clin Invest **25**(2): 90-6.
- Havelund, S, Plum, A, Ribel, U, Jonassen, I, Volund, A, Markussen, JKurtzhals, P (2004). "The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin." Pharm Res **21**(8): 1498-504.
- Heinemann, L (2002). "Variability of insulin absorption and insulin action." Diabetes Technol Ther **4**(5): 673-82.
- Heinemann, L, Sinha, K, Weyer, C, Loftager, M, Hirschberger, SHeise, T (1999). "Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304." Diabet Med **16**(4): 332-8.

- Heise, T, Nosek, L, Ronn, BB, Endahl, L, Heinemann, L, Kapitza, CDraeger, E (2004). "Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes." Diabetes **53**(6): 1614-20.
- Henquin, JC, Ravier, MA, Nenquin, M, Jonas, JCGilon, P (2003). "Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion." Eur J Clin Invest **33**(9): 742-50.
- Hermansen, KDavies, M (2007). "Does insulin detemir have a role in reducing risk of insulin-associated weight gain?" Diabetes Obes Metab **9**(3): 209-17.
- Hermansen, K, Fontaine, P, Kukulja, KK, Peterkova, V, Leth, GGall, MA (2004). "Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes." Diabetologia **47**(4): 622-9.
- Hermansen, K, Madsbad, S, Perrild, H, Kristensen, A Axelsen, M (2001). "Comparison of the soluble basal insulin analog insulin detemir with NPH insulin: a randomized open crossover trial in type 1 diabetic subjects on basal-bolus therapy." Diabetes Care **24**(2): 296-301.
- Hirsch, IB (2005). "Insulin analogues." N Engl J Med **352**(2): 174-83.
- Holstein, A, Stege, HKovacs, P (2010). "Lipoatrophy associated with the use of insulin analogues: a new case associated with the use of insulin glargine and review of the literature." Expert Opin Drug Saf **9**(2): 225-31.
- Home, P, Bartley, P, Russell-Jones, D, Hanaire-Broutin, H, Heeg, JE, Abrams, P, Landin-Olsson, M, Hylleberg, B, Lang, HDraeger, E (2004). "Insulin detemir offers improved glycemic control compared with NPH insulin in people with type 1 diabetes: a randomized clinical trial." Diabetes Care **27**(5): 1081-7.
- Home, PKurtzhals, P (2006). "Insulin detemir: from concept to clinical experience." Expert Opin Pharmacother **7**(3): 325-43.
- Home, PD, Lindholm, ARiis, A (2000). "Insulin aspart vs. human insulin in the management of long-term blood glucose control in Type 1 diabetes mellitus: a randomized controlled trial." Diabet Med **17**(11): 762-70.
- Hordern, SV, Wright, JE, Umpleby, AM, Shojaee-Moradie, F, Amiss, JRussell-Jones, DL (2005). "Comparison of the effects on glucose and lipid metabolism of equipotent doses of insulin detemir and NPH insulin with a 16-h euglycaemic clamp." Diabetologia **48**(3): 420-6.
- Houslay, MDSiddle, K (1989). "Molecular basis of insulin receptor function." Br Med Bull **45**(1): 264-84.
- InternationalDiabetesFederation (2010). Prevalence estimates of diabetes mellitus 2010. Diabetesatlas.
- Ishiyama, N, Ravier, MAHenquin, JC (2006). "Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E540-9.
- Jehle, PM, Micheler, C, Jehle, DR, Breitig, DBoehm, BO (1999). "Inadequate suspension of neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin in pens." Lancet **354**(9190): 1604-7.

- Kang, S, Brange, J, Burch, A, Volund, A, Owens, DR (1991). "Subcutaneous insulin absorption explained by insulin's physicochemical properties. Evidence from absorption studies of soluble human insulin and insulin analogues in humans." Diabetes Care **14**(11): 942-8.
- Kapellen, TM, Galler, A, Bottner, AK, Kiess, W (2004). "[Epidemiology, treatment and prevention of type 2 diabetes in children and adolescents]." Dtsch Med Wochenschr **129**(27): 1519-23.
- Kasuga, M, Zick, Y, Blith, DL, Karlsson, FA, Haring, H, UKahn, CR (1982). "Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine." J Biol Chem **257**(17): 9891-4.
- Keller, SR, Lamphere, L, Lavan, BE, Kuhne, M, Lienhard, GE (1993). "Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1." Mol Reprod Dev **35**(4): 346-51; discussion 351-2.
- Kissebah, AH, Peiris, AN (1989). "Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetes Metab Rev **5**(2): 83-109.
- Klein, O, Lynge, J, Endahl, L, Damholt, B, Nosek, L, Heise, T (2007). "Albumin-bound basal insulin analogues (insulin detemir and NN344): comparable time-action profiles but less variability than insulin glargine in type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **9**(3): 290-9.
- Kolendorf, K, Ross, GP, Pavlic-Renar, I, Perriello, G, Philotheou, A, Jendle, J, Gall, MA, Heller, SR (2006). "Insulin detemir lowers the risk of hypoglycaemia and provides more consistent plasma glucose levels compared with NPH insulin in Type 1 diabetes." Diabet Med **23**(7): 729-35.
- Kurtzhals, P (2004). "Engineering predictability and protraction in a basal insulin analogue: the pharmacology of insulin detemir." Int J Obes Relat Metab Disord **28 Suppl 2**: S23-8.
- Kurtzhals, P, Havelund, S, Jonassen, I, Kiehr, B, Larsen, UD, Ribel, U, Markussen, J (1995). "Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo." Biochem J **312 (Pt 3)**: 725-31.
- Kurtzhals, P, Havelund, S, Jonassen, I, Markussen, J (1997). "Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long-acting, acylated insulin analogue." J Pharm Sci **86**(12): 1365-8.
- Kurtzhals, P, Schaffer, L, Sorensen, A, Kristensen, C, Jonassen, I, Schmid, C, Trub, T (2000). "Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use." Diabetes **49**(6): 999-1005.
- Lamph, WW, Wamsley, P, Sassone-Corsi, P, Verma, IM (1988). "Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA." Nature **334**(6183): 629-31.
- Lang, DA, Matthews, DR, Peto, J, Turner, RC (1979). "Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings." N Engl J Med **301**(19): 1023-7.

- Laplante, M, Festuccia, WT, Soucy, G, Gelinas, Y, Lalonde, J, Berger, JPD, Deshaies, Y (2006). "Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action on adipose tissue metabolism." Diabetes **55**(10): 2771-8.
- Lara-Castro, C, Fu, Y, Chung, BH, Garvey, WT (2007). "Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease." Curr Opin Lipidol **18**(3): 263-70.
- Le Floch, JP, Levy, M, Mosnier-Pudar, H, Nobels, F, Laroche, S, Gonbert, S, Eschwege, E, Fontaine, P (2009). "Comparison of once- versus twice-daily administration of insulin detemir, used with mealtime insulin aspart, in basal-bolus therapy for type 1 diabetes: assessment of detemir administration in a progressive treat-to-target trial (ADAPT)." Diabetes Care **32**(1): 32-7.
- Lee, JP, Pilch, PF (1994). "The insulin receptor: structure, function, and signaling." Am J Physiol **266**(2 Pt 1): C319-34.
- Levandoski, LA, White, NH, Santiago, JV (1982). "Localized skin reactions to insulin: insulin lipodystrophies and skin reactions to pumped subcutaneous insulin therapy." Diabetes Care **5 Suppl 1**: 6-10.
- Liang, X, Kanjanabuch, T, Mao, SL, Hao, CM, Tang, YW, Declerck, PJ, Hasty, AH, Wasserman, DH, Fogo, AB, Ma, LJ (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(1): E103-E113.
- Lindholm, A (2002). "New insulins in the treatment of diabetes mellitus." Best Pract Res Clin Gastroenterol **16**(3): 475-92.
- Löffler, G (Hrsg.) (2007). Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag. **8. Aufl.**
- MacDougald, O, Lane, MD (1995). "Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation." Annu Rev Biochem **64**: 345-73.
- Machinal-Quelin, F, Dieudonne, MN, Leneuve, MC, Pecquery, R, Giudicelli, Y (2002). "Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways." Am J Physiol Cell Physiol **282**(4): C853-63.
- Markussen, J, Havelund, S, Kurtzhals, P, Andersen, AS, Halstrom, J, Hasselager, E, Larsen, UD, Ribel, U, Schaffer, L, Vad, K, Jonassen, I (1996). "Soluble, fatty acid acylated insulins bind to albumin and show protracted action in pigs." Diabetologia **39**(3): 281-8.
- Meneghini, LF, Rosenberg, KH, Koenen, C, Merilainen, MJ, Luddeke, HJ (2007). "Insulin detemir improves glycaemic control with less hypoglycaemia and no weight gain in patients with type 2 diabetes who were insulin naive or treated with NPH or insulin glargine: clinical practice experience from a German subgroup of the PREDICTIVE study." Diabetes Obes Metab **9**(3): 418-27.
- Miyazaki, Y, Mahankali, A, Matsuda, M, Mahankali, S, Hardies, J, Cusi, K, Mandarino, LJ, DeFronzo, RA (2002). "Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2784-91.

- Monami, M, Lamanna, C, Marchionni, NMannucci, E (2009a). "Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily insulin injections in type 2 diabetes: a meta-analysis." Exp Clin Endocrinol Diabetes **117**(5): 220-2.
- Monami, M, Marchionni, NMannucci, E (2009b). "Long-acting insulin analogues vs. NPH human insulin in type 1 diabetes. A meta-analysis." Diabetes Obes Metab **11**(4): 372-8.
- Mounier, CPosner, BI (2006). "Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene." Can J Physiol Pharmacol **84**(7): 713-24.
- Nauck, MA, Meier, JJCreutzfeldt, W (2003). "Incretins and their analogues as new antidiabetic drugs." Drug News Perspect **16**(7): 413-22.
- Newsholme, P, Gaudel, CMcClenaghan, NH (2010). "Nutrient Regulation of Insulin Secretion and beta-Cell Functional Integrity." Adv Exp Med Biol **654**: 91-114.
- Novikoff, AB, Novikoff, PM, Rosen, OMRubin, CS (1980). "Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes." J Cell Biol **87**(1): 180-96.
- O'Brien, RM, Streeper, RS, Ayala, JE, Stadelmaier, BTHornbuckle, LA (2001). "Insulin-regulated gene expression." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 552-8.
- Olefsky, JM, Marshall, S, Berhanu, P, Saekow, M, Heidenreich, KGreen, A (1982). "Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes." Metabolism **31**(7): 670-90.
- Ottensmeyer, FP, Beniac, DR, Luo, RZYip, CC (2000). "Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor." Biochemistry **39**(40): 12103-12.
- Otto, TCLane, MD (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(4): 229-42.
- Owens, DR, Zinman, B, Bolli, GB (2001). "Insulins today and beyond." Lancet **358**(9283): 739-46.
- Packianathan, IC, Fuller, NJ, Peterson, DB, Wright, A, Coward, WAFiner, N (2005). "Use of a reference four-component model to define the effects of insulin treatment on body composition in type 2 diabetes: the 'Darwin study'." Diabetologia **48**(2): 222-9.
- Pairault, JGreen, H (1979). "A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5138-42.
- Path, G, Bornstein, SR, Gurniak, M, Chrousos, GP, Scherbaum, WAHauner, H (2001). "Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2281-8.
- Perlman, R, Bottaro, DP, White, MFKahn, CR (1989). "Conformational changes in the alpha- and beta-subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies." J Biol Chem **264**(15): 8946-50.
- Petruschke, THauner, H (1993). "Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells." J Clin Endocrinol Metab **76**(3): 742-7.

- Petruschke, T, Rohrig, KHauner, H (1994). "Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture." Int J Obes Relat Metab Disord **18**(8): 532-6.
- Pieber, TR, Draeger, E, Kristensen, AGrill, V (2005). "Comparison of three multiple injection regimens for Type 1 diabetes: morning plus dinner or bedtime administration of insulin detemir vs. morning plus bedtime NPH insulin." Diabet Med **22**(7): 850-7.
- Plank, J, Bodenlenz, M, Sinner, F, Magnes, C, Gorzer, E, Regittnig, W, Endahl, LA, Draeger, E, Zdravkovic, MPieber, TR (2005). "A double-blind, randomized, dose-response study investigating the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the long-acting insulin analog detemir." Diabetes Care **28**(5): 1107-12.
- Qiu, Z, Wei, Y, Chen, N, Jiang, M, Wu, JLiao, K (2001). "DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes." J Biol Chem **276**(15): 11988-95.
- Rabkin, R, Reaven, GMMondon, CE (1986). "Insulin metabolism by liver, muscle, and kidneys from spontaneously diabetic rats." Am J Physiol **250**(5 Pt 1): E530-7.
- Rabkin, R, Ryan, MPDuckworth, WC (1984). "The renal metabolism of insulin." Diabetologia **27**(3): 351-7.
- Radermecker, RP, Pierard, GEScheen, AJ (2007). "Lipodystrophy reactions to insulin: effects of continuous insulin infusion and new insulin analogs." Am J Clin Dermatol **8**(1): 21-8.
- Raskin, P, Guthrie, RA, Leiter, L, Riis, AJovanovic, L (2000). "Use of insulin aspart, a fast-acting insulin analog, as the mealtime insulin in the management of patients with type 1 diabetes." Diabetes Care **23**(5): 583-8.
- Raskin, P, Gylvin, T, Weng, WChaykin, L (2009). "Comparison of insulin detemir and insulin glargine using a basal-bolus regimen in a randomized, controlled clinical study in patients with type 2 diabetes." Diabetes Metab Res Rev **25**(6): 542-8.
- Reed, BCLane, MD (1980). "Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 285-9.
- Richardson, TKerr, D (2003). "Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies." Am J Clin Dermatol **4**(10): 661-7.
- Rizza, RA, Gerich, JE, Haymond, MW, Westland, RE, Hall, LD, Clemens, AHSservice, FJ (1980). "Control of blood sugar in insulin-dependent diabetes: comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy." N Engl J Med **303**(23): 1313-8.
- Rolla, A (2008). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic advantages of insulin analogues and premixed insulin analogues over human insulins: impact on efficacy and safety." Am J Med **121**(6 Suppl): S9-S19.
- Rosen, ED, Walkey, CJ, Puigserver, PSpiegelman, BM (2000). "Transcriptional regulation of adipogenesis." Genes Dev **14**(11): 1293-307.
- Rosen, OM (1987). "After insulin binds." Science **237**(4821): 1452-8.

- Rosenstock, J, Davies, M, Home, PD, Larsen, J, Koenen, CSchernthaler, G (2008). "A randomised, 52-week, treat-to-target trial comparing insulin detemir with insulin glargine when administered as add-on to glucose-lowering drugs in insulin-naive people with type 2 diabetes." Diabetologia **51**(3): 408-16.
- Russell-Jones, DKhan, R (2007). "Insulin-associated weight gain in diabetes--causes, effects and coping strategies." Diabetes Obes Metab **9**(6): 799-812.
- Saladin, R, Fajas, L, Dana, S, Halvorsen, YD, Auwerx, JBriggs, M (1999). "Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis." Cell Growth Differ **10**(1): 43-8.
- Saltiel, ARKahn, CR (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Schatz, H (2006). Diabetologie kompakt, Thieme Verlag. **4. Auflage**.
- Schell, U, Grun, MHilgenfeld, R (2000). "Binding of insulin to its receptor: towards an understanding in three dimensions." ChemBiochem **1**(1): 37-40.
- Schlesinger, JB, van Harmelen, V, Alberti-Huber, CEHauner, H (2006). "Albumin inhibits adipogenesis and stimulates cytokine release from human adipocytes." Am J Physiol Cell Physiol **291**(1): C27-33.
- Sheldon, B, Russell-Jones, DWright, J (2009). "Insulin analogues: an example of applied medical science." Diabetes Obes Metab **11**(1): 5-19.
- Simons, PJ, van den Pangaart, PS, van Roomen, CP, Aerts, JMBoon, L (2005). "Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers." Cytokine **32**(2): 94-103.
- Slieker, LJ, Brooke, GS, DiMarchi, RD, Flora, DB, Green, LK, Hoffmann, JA, Long, HB, Fan, L, Shields, JE, Sundell, KL, Surface, PLChance, RE (1997). "Modifications in the B10 and B26-30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor." Diabetologia **40 Suppl 2**: S54-61.
- Smith, PJ, Wise, LS, Berkowitz, R, Wan, CRubin, CS (1988). "Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **263**(19): 9402-8.
- Sopasakis, VR, Sandqvist, M, Gustafson, B, Hammarstedt, A, Schmelz, M, Yang, X, Jansson, PAsmith, U (2004). "High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator." Obes Res **12**(3): 454-60.
- Staiger, HBrockhoff, G (2005a). "The role of PDGF-dependent postconfluent mitoses in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." Diabetes und Stoffwechsel **14/2005**.
- Staiger, HHaring, HU (2005b). "Adipocytokines: fat-derived humoral mediators of metabolic homeostasis." Exp Clin Endocrinol Diabetes **113**(2): 67-79.

- Staiger, H, Löffler, G (1998). "The role of PDGF-dependent suppression of apoptosis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." Eur J Cell Biol **77**(3): 220-7.
- Steiner, D, Foye, PE (1967). "The Biosynthesis of Insulin and a Probable Precursor of Insulin by a Human Islet Cell Adenoma." Proc Natl Acad Sci U S A **57**(2): 473-480.
- Student, AK, Hsu, RY, Lane, MD (1980). "Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." J Biol Chem **255**(10): 4745-50.
- Sures, I, Goeddel, DV, Gray, AU, Ulrich, A (1980). "Nucleotide sequence of human preproinsulin complementary DNA." Science **208**(4439): 57-9.
- Tontonoz, P, Hu, E, Graves, RA, Budavari, AI, Spiegelman, BM (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." Genes Dev **8**(10): 1224-34.
- Torti, FM, Torti, SV, Larrick, JW, Ringold, GM (1989). "Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta." J Cell Biol **108**(3): 1105-13.
- Tschritter, O, Hennige, AM, Preissl, H, Porubská, K, Schafer, SA, Lutzenberger, W, Machicao, F, Birbaumer, N, Fritsche, AH, Haring, HU (2007). "Cerebrocortical beta activity in overweight humans responds to insulin detemir." PLoS One **2**(11): e1196.
- UKPDS (1998). "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." Lancet **352**(9131): 837-53.
- Ulrich, A, Bell, JR, Chen, EY, Herrera, R, Petruzzelli, LM, Dull, TJ, Gray, A, Coussens, L, Liao, YC, Tsubokawa, M, et al. (1985). "Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes." Nature **313**(6005): 756-61.
- Ulrich, A, Shine, J, Chirgwin, J, Pictet, R, Tischler, E, Rutter, WJ, Goodman, HM (1977). "Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences." Science **196**(4296): 1313-9.
- Vague, P, Selam, JL, Skeie, S, De Leeuw, I, Elte, JW, Haahr, H, Kristensen, AD, Raeger, E (2003). "Insulin detemir is associated with more predictable glycemic control and reduced risk of hypoglycemia than NPH insulin in patients with type 1 diabetes on a basal-bolus regimen with premeal insulin aspart." Diabetes Care **26**(3): 590-6.
- Valensi, P, Cosson, E (2005). "Is insulin detemir able to favor a lower variability in the action of injected insulin in diabetic subjects?" Diabetes Metab **31**(4 Pt 2): 4S34-4S39.
- Valera Mora, ME, Scarfone, A, Calvani, M, Greco, AV, Mingrone, G (2003). "Insulin clearance in obesity." J Am Coll Nutr **22**(6): 487-93.
- Vignati, L, Anderson, JH, Jr, Iversen, PW (1997). "Efficacy of insulin lispro in combination with NPH human insulin twice per day in patients with insulin-dependent or non-insulin-dependent diabetes mellitus. Multicenter Insulin Lispro Study Group." Clin Ther **19**(6): 1408-21.
- Virtanen, KA, Hallsten, K, Parkkola, R, Janatuinen, T, Lonqvist, F, Viljanen, T, Ronnema, T, Knuuti, J, Huupponen, R, Lonroth, P, Nuutila, P (2003).

- "Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects." Diabetes **52**(2): 283-90.
- Wabitsch, M, Hauner, H, Hertrampf, M, Mucbe, R, Hay, B, Mayer, H, Kratzer, W, Debatin, KMHeinze, E (2004). "Type II diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Caucasian children and adolescents with obesity living in Germany." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(2): 307-13.
- Wajchenberg, BL, Giannella-Neto, D, da Silva, MESantos, RF (2002). "Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome." Horm Metab Res **34**(11-12): 616-21.
- Waldhausl, WK (1986). "The physiological basis of insulin treatment--clinical aspects." Diabetologia **29**(12): 837-49.
- White, MF (1997). "The insulin signalling system and the IRS proteins." Diabetologia **40 Suppl 2**: S2-17.
- White, MF, Haring, HU, Kasuga, MKahn, CR (1984). "Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells." J Biol Chem **259**(1): 255-64.
- White, MFKahn, CR (1994). "The insulin signaling system." J Biol Chem **269**(1): 1-4.
- White, MF, Shoelson, SE, Keutmann, HKahn, CR (1988). "A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor." J Biol Chem **263**(6): 2969-80.
- White, MFKYenush, L (1998). "The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action." Curr Top Microbiol Immunol **228**: 179-208.
- Whittingham, JL, Havelund, SJonassen, I (1997). "Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties." Biochemistry **36**(10): 2826-31.
- Wild, S, Roglic, G, Green, A, Sicree, RKing, H (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-53.
- Wilde, MIMcTavish, D (1997). "Insulin lispro: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of diabetes mellitus." Drugs **54**(4): 597-614.
- Wing, RR, Klein, RMoss, SE (1990). "Weight gain associated with improved glycemic control in population-based sample of subjects with type I diabetes." Diabetes Care **13**(11): 1106-9.
- Wise, LSGreen, H (1979). "Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells." J Biol Chem **254**(2): 273-5.

9. Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie natürlich Prof. Dr. Dr. Häring, der mir durch Bereitstellung des Themas und seiner Labore diese Promotion ermöglicht hat.

Ebenso den Mitarbeitern Prof. Dr. Reiner Lammers, PD Dr. Anita Hennige, PD Dr. Karsten Müssig, Martina Melzer, Elisabeth Metzinger und ganz besonders Carina Haas, die mich mit ihrer langjährigen Erfahrung jederzeit tatkräftig unterstützt haben.

Nicht genug bedanken kann ich mich jedoch bei meinem hervorragenden Betreuer Prof. Dr. Harald Staiger, der mir die Arbeit in dieser Form möglich gemacht hat, mir mit Ideenreichtum, Engagement, seinem herausragenden Wissen und Erfahrungsschatz immer ein großes Vorbild gewesen ist. Jederzeit war es mir möglich, Fragen und Probleme zu diskutieren und umgehend zu lösen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Christoph Böhm für die Motivation und ausdauernde Hilfe, meinen Eltern und Tobias Moller für die Korrektur sowie Ulrike Hau und Esther Saup für die tolle Unterstützung in den letzten Zügen dieser Promotion.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten sind in folgende Präsentationen eingegangen:

- **Publikation:** Bohm, A, Staiger, H, Hennige, AM, Haas, C, Machicao, F, Haring, HU (2008). "Effect of insulin detemir, compared to human insulin, on 3T3-L1 adipogenesis." Regul Pept **151**(1-3): 160-3.
- **Vortrag:** Jahrestagung der YAR 2007: „Effects of insulin detemir on differentiation of 3T3-L1-preadipocytes“
- **Poster:**
 - o DDG 2007, Hamburg: „Insulin Detemir weist im 3T3-L1-Zellmodell im Vergleich zu Normalinsulin deutlich geringere adipogene Eigenschaften auf“. BöhmA, StaigerH, MachicaoF, HäringHU
 - o ADA 2008, San Francisco: „Effects of Insulin Detemir, compared to Normal Insulin, on serum-free Adipose Conversion of 3T3-L1 Preadipocytes“. StaigerH, BohmA, MachicaoF, HaringHU

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Anja Böhm
Geburtsdatum:	19. September 1983 in Aschaffenburg
Familienstand:	Ledig
Konfession:	römisch-katholisch

Schulbildung

1993 – 1996	Spessart-Gymnasium Alzenau
1996 – 2002	Reuchlin-Gymnasium Pforzheim (allgemeine Hochschulreife)

Studium

2002 – 2009	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/2004	Ärztliche Vorprüfung
05.06.2009	2. Ärztliche Prüfung

Praktisches Jahr

08/2007 – 11/2007	Innere Medizin am Universitätsklinikum Tübingen (Gastroenterologie und Kardiologie)
12/2007 – 03/2008	Anästhesiologie am Universitätsklinikum Tübingen
04/2008 – 08/2008	Universidad católica de Córdoba, Argentinien
2006- 2010	Promotion bei Prof. Dr. Häring in der Abteilung IV der Universitätsklinik Tübingen

Berufstätigkeit

8/2009-12/2010	Assistenzärztin, Universitätsklinik Lübeck
Seit 3/2011	Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universitätsklinik Tübingen