

**Aus der Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms**

**Analyse der Expression des proliferationsassoziierten Proteins P8  
in Betazellen des endokrinen Pankreas**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Anita Knoll  
aus Würzburg**

**Würzburg, August 2004**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. J. Seufert

**Koreferent:** Prof. Dr. med. F. Jakob

**Dekan:** Prof. Dr. med. S. Silbernagl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 09.02.2005

**Die Promovendin ist Ärztin**



# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
<b>1.1</b>	<b>Diabetes mellitus und Betazellfunktion</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Inseltransplantation und Zelltherapie des Diabetes mellitus</b>	<b>2</b>
1.2.1	Inseltransplantation	3
1.2.2	Zelltherapie	4
<b>1.3</b>	<b>Molekulare Regulation der Betazell-Funktion und Betazell-Proliferation im endokrinen Pankreas</b>	<b>5</b>
1.3.1	Regulation der Insulingenexpression durch Glukose	7
1.3.2	Das Homeodomainprotein PDX-1	7
1.3.3	Regulation der Insulingenexpression durch Glukagon-like Peptide 1	8
1.3.4	Molekulare Regulation der Proliferation der Betazellen im endokrinen Pankreas	9
<b>1.4</b>	<b>Das Protein P8</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	
<b>2.1</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Enzyme</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Verwendete Laborkits</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>18</b>
<b>2.6</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>18</b>
<b>2.7</b>	<b>Medien und Nährböden</b>	<b>19</b>
<b>2.8</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>19</b>
<b>2.9</b>	<b>Medien für die Zellkultur</b>	<b>20</b>
<b>2.10</b>	<b>Plasmide</b>	<b>21</b>
<b>2.11</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>22</b>
<b>2.12</b>	<b>Größenmarker</b>	<b>24</b>

<b>2.13 Antiserum</b>	<b>24</b>
<b>3 Methoden</b>	
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>25</b>
3.1.1 Hitzeinaktivierung von Serum	25
3.1.2 Stammerhaltung der Zelllinien	25
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	26
<b>3.2 Ribonukleinsäure (RNA) - Extraktion</b>	<b>27</b>
3.2.1 Extraktion der RNA	27
3.2.2 DNase 1-Verdau der Ribonukleinsäure	27
3.2.3 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	28
<b>3.3 Reverse Transkription / Polymerasekettenreaktion</b>	<b>29</b>
3.3.1 Reverse Transkription	29
3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
<b>3.4 Agarose-Gelelektrophorese der cDNA-Proben</b>	<b>30</b>
3.4.1 Gel, Laufpuffer	31
<b>3.5 Subklonierung</b>	<b>32</b>
3.5.1 Restriktion	32
3.5.2 Agarosegelelektrophorese	33
3.5.3 Elution von DNA aus Agarosegelen	33
3.5.4 Ligation	34
3.5.5 Herstellung kompetenter Zellen	34
3.5.6 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock	35
3.5.7 Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation	36
3.5.8 Plasmidpräparation	36
3.5.9 Restriktionen zur Überprüfung isolierter Plasmide (Einfach- bzw. Doppelverdau)	37
<b>3.6 TOPO-TA-Klonierung</b>	<b>37</b>
<b>3.7 DNA-Sequenzierung</b>	<b>38</b>
<b>3.8 Luciferase-Reportergenassay</b>	<b>39</b>

3.8.1	Transfektion in INS-1-Zellen, COS-7-Zellen und INS-1-Stables	39
3.8.2	Gewinnung der Zellextrakte	40
3.8.3	Messung der Luciferaseaktivität nach Transfektion	41
<b>3.9</b>	<b>ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)</b>	<b>41</b>
3.9.1	Probenvorbereitung	41
3.9.2	Messung	42
<b>3.10</b>	<b>Generierung eines P8-Antiserums</b>	<b>42</b>
3.10.1	Klonierung eines P8-GST-Fusionsproteins	42
3.10.2	Bakterielle Expression des P8-GST-Fusionsproteins	43
3.10.2.1	Bakterienwachstum und Induktion	43
3.10.2.2	Bakterienlysat	44
3.10.2.3	Proteinelution über die Glutathion-Sepharose-4B-Säule	44
3.10.3	Produktion des Antiserums	46
3.10.3.1	Charakterisierung des polyklonalen P8-Kaninchen-Antiserums	46
3.10.3.2	Herstellung von Proteinextrakten	47
3.10.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49
3.10.3.4	Probenvorbereitung bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.10.3.5	Probenvorbereitung bei Tris-Tricine-Gelelektrophorese	50
3.10.3.6	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	51
3.10.3.7	Tris-Tricine-Gelelektrophorese	52
3.10.3.8	Western-Blot	53
3.10.3.9	Immunodetektion	55
3.10.3.10	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen	55
<b>3.11</b>	<b>Fluoreszenzimmunzytochemie</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>4.1</b>	<b>Etablierung eines polyklonalen Kaninchen-P8-Antiserums</b>	<b>57</b>
4.1.1	Klonierung des Expressionsvektors für GST-P8	57
4.1.2	Expression des P8-GST-Fusionsproteins	59
4.1.3	Charakterisierung des Antiserums	60
<b>4.2</b>	<b>Zelluläre Lokalisation von P8</b>	<b>63</b>

<b>4.3</b>	<b>Nachweis von P8 in endokrinen Betazellen und dukta-</b>	
	<b>Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>Regulation der Expression von P8 auf mRNA-Ebene</b>	<b>66</b>
4.4.1	Regulation der Expression von P8 durch Glukose	66
4.4.2	Regulation der Expression von P8 durch Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1)	71
<b>4.5</b>	<b>Subklonierung verschiedener Vektoren</b>	<b>74</b>
4.5.1	Klonierung von rp8pcDNA 3.1+	74
4.5.2	Klonierung von rp8pcDNA I	75
4.5.3	Klonierung von mp8pcR2.1 TOPO	77
<b>4.6</b>	<b>Einfluss der P8-Überexpression auf die PDX-1-Genexpression und die</b>	
	<b>Proinsulin-Genexpression in Betazellen des endokrinen Pankreas</b>	<b>78</b>
4.6.1	Transiente Transfektion (Luziferase-Assays)	84
4.6.1.1	Einfluss von P8 auf den mPDX-1-Promotor	84
4.6.1.2	Einfluss von P8 auf den Insulinpromotor	87
<b>4.7</b>	<b>Einfluss der P8-Überexpression auf die Insulinbiosynthese und die</b>	
	<b>Insulinsekretion in Betazellen (ELISA)</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	
5.1	P8 als proliferationsinduzierendes Protein	92
5.2	Glukoseabhängige Regulation von P8 in INS-1- und AR42-J-Zellen	93
5.3	GLP-1 abhängige P8-Expression in INS-1 und AR42-J-Zellen	94
5.4	P8 und betazellspezifische Genexpression	95
5.5	P8 und Betazellfunktion	97
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# **1 Einleitung**

## **1.1 Diabetes mellitus und Betazellfunktion**

Diabetes mellitus (lat. honigsüßer Durchfluss) ist die häufigste endokrine Störung des Glukosestoffwechsels. Man unterscheidet verschiedene Formen (Typ 1, Typ 2, sekundärer Diabetes und Gestationsdiabetes) unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik, welche als gemeinsames Kennzeichen den relativen oder absoluten Insulinmangel aufweisen [1]. Dieser hat eine dauerhafte Erhöhung des Blutzuckers (Hyperglykämie) zur Folge, beziehungsweise eine zeitlich inadäquate Verwertung zugeführter Glukose (gestörte Glukosetoleranz). Knapp 5 % der deutschen Bevölkerung sind an einem Diabetes mellitus erkrankt, wovon der Anteil an Typ 2 Diabetikern 90 % darstellt. In Mitteleuropa beträgt die Häufigkeit des Typ 1-Diabetes ca. 0,3 - 0,4 % der Bevölkerung, die des Typ 2 Diabetes ca. 4 %. Der Diabetes mellitus Typ 2 beruht auf einem relativen Insulindefizit, welches zum einen durch einen fortschreitenden Funktionsverlust der Betazelle der Langerhansinseln sowie durch eine periphere Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Diese Form des Diabetes tritt häufig im Rahmen eines metabolischen Syndroms in Assoziation mit anderen metabolischen Veränderungen wie Hypertonie, Dyslipidämie und Adipositas auf. Bei dem Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich dagegen um eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die durch genetische Faktoren sowie durch Umweltfaktoren determiniert ist. Hierbei kommt es zu einer T-Zell-vermittelten progressiven autoimmunen Destruktion der insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas. Die Krankheit präsentiert sich vor allem in jungen Jahren im Sinne eines absoluten Insulinmangels, sobald etwa 90 % der Betazellen zerstört sind. Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation lassen sich ein oder mehrere Autoantikörper nachweisen. Die Auswirkungen des Insulinmangels sind mannigfaltig. Die fehlende Aufnahme von Glukose in die Zellen des Körpers und des sich daraus ergebenden Energiemangels resultiert in einem Anstieg der Glykogenolyse und Glukoneogenese wie auch der Lipolyse und Ketonkörperbildung, um Energiequellen zu mobilisieren. Weiterhin werden Proteine in den Muskel- und Leberzellen abgebaut, wodurch es zu starken Eiweißverlusten und



zunehmender Harnstoffbildung kommt. Die bestehende Hyperglykämie bewirkt eine osmotische Diurese mit beträchtlichen Wasser- und Elektrolytverlusten (vornehmlich Natrium und Kalium) und konsekutiver Exsikkose. Die zusätzlichen Kaliumverluste verstärken die ketoazidotische Stoffwechsellage, die unbehandelt zum Koma führen kann. Dies stellt sich häufig als Erstmanifestation eines Typ 1 Diabetes dar. Sekundärkomplikationen des Diabetes mellitus sind hauptsächlich durch pathologische Gefäßveränderungen bedingt. Die von den mikroangiopathischen Veränderungen am stärksten betroffenen Organe sind Niere, Retina und das periphere Nervensystem im Sinne einer diabetischen Glomerulosklerose, Retinopathie und Neuropathie. Makroangiopathische Veränderungen affektieren dagegen das Herz und die Extremitäten, woraus eine koronare Herzkrankheit als auch periphere Verschlusskrankheit resultiert. Zudem ist das Risiko für einen zerebralen Insult erhöht. Das derzeitige Therapieschema des Diabetes mellitus Typ 1 beruht auf der exogenen Insulinzufuhr, wodurch Blutzuckerspitzen nicht immer vermieden werden können und gleichzeitig ein Risiko für Hypoglykämien besteht. Eine weitere Möglichkeit stellen die Pankreas- und Inseltransplantation dar, wobei der Mangel an Spenderorganen die weite Verfügbarkeit dieses Verfahrens einschränkt und es einer stark immunsuppressiven Therapie bedarf. Daher ist es von großer Bedeutung, neue Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus zu entwickeln, um den progressiven Verlauf der Erkrankung mit allen resultierenden Sekundärschäden zu verhindern und gleichzeitig die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

## **1.2 Inseltransplantation und Zelltherapie des Diabetes mellitus**

Die Behandlungsstrategie des Diabetes mellitus Typ 1 beruht derzeit primär auf der intensivierten Insulintherapie, welche täglich mehrfache Blutzuckerkontrollen, subkutane Insulininjektionen und diätetische Maßnahmen erfordert. Hierdurch wird eine relative Glukosehomeostase aufrechterhalten, wobei die Gefahren von hypoglykämischen Zuständen und Spätkomplikationen aufgrund der Hyperglykämie weiter bestehen. Eine der kausalen Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus stellt die Pankreastransplantation dar. Aufgrund des hohen perioperativen Risikos und der dadurch erforderlichen lebenslangen intensiven Immunsuppression werden derzeit in

der Mehrzahl der Fälle nur kombinierte Nieren-Pankreastransplantationen bei Patienten mit schwerem Diabetes mellitus Typ1 und gleichzeitiger terminaler Niereninsuffizienz durchgeführt.

### **1.2.1 Inseltransplantation**

Der Anteil der endokrinen Zellen des Pankreas beträgt nur 2% des gesamten Organs, der größte Teil besteht aus exokrinem Gewebe, welches beim Diabetes mellitus nicht affektiert ist. Der Gewebeersatz von Insulin produzierenden Betazellen wäre somit ausreichend zur Therapie des Diabetes mellitus. Eines dieser Therapieprinzipien stellt die allogene Transplantation von adulten Pankreasinseln dar (Inseltransplantation). Die Pankreasinseln werden vom Spenderpankreas extrahiert, gereinigt und in die Portalvene des Empfängers injiziert [2]. Hierfür wurden Strategien entwickelt, um langfristig ein Transplantatüberleben sowie die Funktion des Transplantates zu sichern. Große Fortschritte wurden unter anderem durch die Anwendung des sogenannten „Edmontonprotokolls“ erzielt. Dieses beschreibt die Optimierung der Isolierung der Inselzellen wie auch die Verwendung weniger betazelltoxischer Immunsuppressiva (steroidfreie Immunsuppression, Sirolimus, Tacrolimus, Daclizumab) nach Transplantation [3]. Ein großes Problem bezüglich der Anwendung des „Edmontonprotokolls“ stellt die hohe Anzahl der erforderlichen Spenderorgane dar, da jeder Patient Pankreasinseln von mindestens zwei Spenderorganen benötigt. Der Mangel an Spenderorganen schränkt jedoch die weite Verfügbarkeit dieser Behandlung für die überwiegende Anzahl der Diabetiker stark ein. Daher besteht ein großer Bedarf an alternativen Ressourcen für Betazellen oder Äquivalenten. Durch eine Verbesserung des Transplantatüberlebens in der peri- und postoperativen Phase sowie durch eine Verminderung der benötigten Anzahl an Inseln wäre es möglich, die Kapazität von vorhandenem Gewebe zu vergrößern.

## 1.2.2 Zelltherapie

Eine andere Möglichkeit bestünde darin, alternative Ressourcen von glukoseresponsiven, insulinsezernierenden Zellen zu etablieren, die für die Transplantation geeignet wären, sogenannte Zelltherapie. Derartige potentielle Quellen stellen nicht-humane Betazellen, Zellen, die Betazellfunktion erlangen, Stammzellen oder Progenitorzellen, welche durch spezifische Induktion zu Betazellen differenzieren, und Betazellen, die in vitro proliferieren, dar. Die Voraussetzung für derartige Zellen wäre die Konservierung der Betazellfunktion und die Fähigkeit der Insulinproduktion, -speicherung und -sekretion sowie eine adäquate Glukosesensitivität und Responsivität. Um eine ausreichend große Menge an Gewebe zu erhalten, müssten die Zellen in Kultur proliferieren, wobei ein Tumorwachstum auszuschließen ist. Weiterhin muss sichergestellt sein, dass die Zellen keine infektiösen Erreger übertragen, welches eines der Probleme der Xenotransplantation darstellt. Eine Schwierigkeit bei der Entwicklung von Betazellen aus anderen Geweben besteht vor allem in der Vermittlung der Glukosesensitivität und Glukoseresponsivität mit adäquater Insulinausschüttung [4]. Die Induktion der Inselzellproliferation und die Neogenese von endokrinem Restgewebe oder fetalen Pankreastransplantaten stellen weitere Möglichkeiten dar. Sowohl die Replikation von bereits existierenden Betazellen als auch die Betazellneogenese führen zur Pankreasregeneration [5], [6]. Ein gravierendes Problem der Zellexpansion stellt dabei die Dedifferenzierung der proliferierenden Zellen dar, wodurch diese die Insulinexpression und andere betazellspezifische Funktionen, die für die Glukoseresponsivität wichtig sind, verlieren [7]. Eine Möglichkeit, um eine verstärkte Proliferation der Inselzellen zu erreichen, wären somit Zellen, die noch keine endgültige Differenzierung besitzen, wie zum Beispiel fetale Inselzellen oder inselzellähnliche Zellverbände [8]. Eine Vielzahl von Beweisen unterstützt auch die Hypothese eines duktales Ursprungs der Inselzellneogenese [9], [10], [11], [12]. Für Pankreasepithelzellen konnte bereits in vitro die Differenzierung in reife Betazellen gezeigt werden [13]. Weiterhin wurden murine Pankreasgangepithelzellen erfolgreich für 6 - 8 Monate kultiviert und zu funktionsfähigen Inselzellen differenziert, wodurch ein insulinabhängiger Diabetes mellitus in NOD-Mäusen (non-obese diabetic) rückgängig gemacht werden konnte [14]. Auch humane Pankreasgangzellen wurden in

in vitro expandiert und deren Differenzierung zu glukoseresponsiven Inselzellen induziert [15]. Intensive Untersuchungen erfolgten auch bezüglich der Existenz von regenerativen Faktoren, welche die Entwicklung der endokrinen Zellen induzieren und die Fähigkeit besitzen, de novo eine Differenzierung von Progenitorzellen zu Betazellen zu stimulieren. Kandidaten für derartige regenerative Faktoren stellen Mitglieder der Reg-Familie [16], das „islet associated neogenesis protein“ (INGAP) [17], das „augmenter of liver regeneration“ (ALR) [18] und „Glukagon-like Peptide 1“ (GLP-1) [19] dar. Für GLP-1 konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass duktale Pankreaszellen, welche das „pancreatic duodenal homeobox-1 protein“ (PDX-1) exprimieren, durch GLP-1 in insulinsezernierende Zellen differenzieren [20]. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF, IGF-1, KGF und TGF $\alpha$  sind ebenfalls indirekt oder direkt in die Inselzellproliferation und Neogenese involviert [21]. Weiterhin sind die Zellen stark abhängig von einer komplexen zellulären Matrix, die den Zellkontakt und das Wachstum unterstützt [22], [23]. Eine vielversprechende Quelle stellen auch adulte oder embryonale Vorläuferzellen für Betazellen dar, welche zu insulinproduzierenden Zellen differenzieren können [24].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Weiterentwicklung der Zelltherapie als kausale Therapiemöglichkeit des Diabetes mellitus von zentraler Bedeutung ist. Hierbei stellt sich bisher heraus, dass vor allem die Expansion und Differenzierung der Pankreasgangzellen eine Möglichkeit sein könnte, den Mangel an Zellen zur Transplantation zu überwinden.

### **1.3 Molekulare Regulation der Betazell-Funktion und Betazell-Proliferation im endokrinen Pankreas**

Die molekulare Regulation der Betazelle wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren bestimmt. Dieses führt entweder zur Aktivierung der Transkription des Insulingens mit darauffolgender Insulinausschüttung oder zu dessen Inhibition. Eine wichtige Rolle spielen Ernährungsfaktoren wie Glukose und Fettsäuren, die Hormone Insulin, Glukagon-like Peptide 1, Leptin, das Wachstumshormon (GH) und Prolaktin, verschiedene Transkriptionsfaktoren (PDX-1, BETA 2, RIPE3b1-Act/C1, E2A, HEB u.a.), deren Bindungsstellen am Insulingenpromotor und

Signaltransduktionswege. Die einzigartige Kombination der ubiquitär vorkommenden und inselspezifischen Transkriptionsfaktoren, sowie deren synergistische Aktivierung der Transkription ermöglicht die betazellspezifische Expression des Insulins [25]. Hierbei sind sowohl direkte Interaktionen zwischen DNA und Proteinen, Proteinen untereinander sowie deren relative Konzentration im Zellkern von Bedeutung, als auch indirekte Interaktionen mit Beteiligung von Koaktivatoren. Bekannte Koaktivatoren sind die Histon-Acetyltransferasen p300 und CBP [26], [27]. Diese Interaktionen bestimmen die positive wie auch negative Regulation der Genexpression in Betazellen und deren Induzierbarkeit durch externe Stimuli. Die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren und deren Aktivierungspotential kann durch Ernährungsfaktoren oder hormonelle Stimuli über Kinase-abhängige Signaltransduktion moduliert werden. Durch die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen und Phosphatasen wird der Phosphorylierungszustand der Transkriptionsfaktoren modifiziert und die Genexpression kontrolliert. Bei Betazellen sind verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben worden, bei welchen die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Kalzium-Kalmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) und mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) involviert sind [28]. Zur Bindung von Transkriptionsfaktoren, die für die kontrollierte Genexpression von Bedeutung sind, enthält der Insulinpromotor selbst spezifische Erkennungssequenzen für DNA-Bindungsproteine, sogenannte „Cis-Acting-Elements“. Zu den wichtigsten zählen die E-Elemente, A-Elemente und das C1-Element [25]. E-Elemente binden Faktoren der Familie der „Basic Helix-Loop-Helix“-Transkriptionsfaktoren (bHLH). Diese sind starke Aktivatoren der gewebespezifischen Transkription, indem sie Heterodimere zwischen ubiquitären und zellspezifischen Faktoren bilden. A-Elemente sind AT-reiche Sequenzen. Die TAAT-Sequenz stellt eine Bindungsstelle für Homeodomain-Transkriptionsfaktoren dar. Diese Gruppe der Transkriptionsfaktoren enthält ein „Helix-Turn-Helix“-Motiv von 61 Aminosäuren, welches an DNA bindet. Der wichtigste Vertreter der Gruppe ist das Protein PDX-1 [29], dessen Funktion im Folgenden noch näher erläutert wird.

### **1.3.1 Regulation der Insulingenexpression durch Glukose**

Glukose ist ein starker physiologischer Stimulator der Insulingentranskription, Insulinsynthese und Insulinsekretion in Betazellen des Pankreas [30], [25]. Erhöhte Blutzuckerkonzentrationen führen zu verstärktem Glukosemetabolismus sowie zu einer vermehrten Insulinsekretion und -biosynthese. Die Schlüsselemente bzgl. der Glukosesensitivität sind der Glukosetransporter 2 und die betazellspezifische Glukokinase (high Km hexokinase) [31]. Initiiert wird die glukoseinduzierte Insulinsekretion in Betazellen durch das Schließen der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle. Hierdurch wird die Plasmamembran depolarisiert und spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen sich. Der darauffolgende Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytoplasma bewirkt die Exozytose [25]. Am Insulinpromotor wird die durch Glukose induzierte Transkription des Insulingens über verschiedene Signalkaskaden und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt, zu welchen auch das Protein PDX-1 zählt [32], [33], [34], [35].

### **1.3.2 Das Homeodomainprotein PDX-1**

PDX-1 wird in insulinproduzierenden Betazellen und somatostatinproduzierenden Deltazellen der Langerhansinseln des endokrinen Pankreas exprimiert und gehört zur Familie der Homeodomain-Transkriptionsfaktoren. Die Homeodomain ist wichtig für die DNA-Bindung und Protein-Interaktionen [29]. PDX-1 ist essentiell für die Pankreasentwicklung und reguliert viele Gene, die für die Betazellfunktion und Identität wichtig sind [36], [37], [38]. Hierzu gehören Insulin [39], der Glukosetransporter 2 [40], [39], Glukokinase [41] und das Islet amyloid polypeptide [42], [43]. Weiterhin reguliert PDX-1 die Expression des Somatostatingens in den Deltazellen der Langerhansinseln [44], wie auch seine eigene Expression [29]. Am Insulingenpromotor vermittelt PDX-1 die glukoseinduzierte Transkription des Insulingens [32], [33], [34], [35]. Erhöhte extrazelluläre Glukosekonzentrationen verstärken die DNA-Bindung von PDX-1 und führen zu dessen Phosphorylierung wie auch Transaktivierung [32], [45]. PDX-1 bindet hierbei an die A-Elemente. Diese liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den

E-Elementen, welche wiederum den Komplex aus den bHLH-Proteinen E47 und Beta 2 / Neuro D binden. Die A- und E-Elemente aktivieren daraufhin synergistisch die Transkription des Insulins. Diese Art „Minienhancer“ des Insulinpromotors, auch FarFlat-Element genannt, ist somit abhängig von der Interaktion des Proteinkomplexes aus PDX-1, Beta 2 / Neuro-D und E47 [46], [47], [48], wobei das bHLH-Protein E47 auch durch andere ubiquitär vorkommende bHLH-Proteine ersetzt werden kann [49]. Wichtig für die Bildung dieses Proteinkomplexes ist zum einen die Homeodomain von PDX-1, aber auch das „High mobility group protein“ (HMGIY), das als architektonisches Protein die Bildung von Kernkomplexen beeinflusst [46]. Dieser Effekt, den der Komplex auf die Transkription des Insulins ausübt, wird durch das Zusammenwirken der verschiedenen Aktivierungsdomänen der Transkriptionsfaktoren vermittelt, die sowohl über Koaktivatoren wie CBP und p300 [50], als auch direkt mit dem Initiierungskomplex an der Transkriptionsstartstelle interagieren. Auch andere Homeodomainproteine wie Lmx1.1 können diesen „Minienhancer“ (A/E) in Kooperation mit E47 aktivieren [51], [46]. Die Genexpression von PDX-1, dessen DNA-Bindungsaktivität als auch sein Transaktivierungspotential wird auch durch das Inkretinhormon Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1) stimuliert [52], [19], [53], [54].

### **1.3.3 Regulation der Insulingenexpression durch Glukagon-like Peptide 1**

Das Inkretinhormon GLP-1 entsteht aus Proglukagon und wird nach der Nahrungsaufnahme von den intestinalen L-Zellen sezerniert. Es zirkuliert zum Pankreas, um dort die Genexpression, Synthese und Sekretion des Insulins in Abhängigkeit von Glukose zu stimulieren [55], [56], [57], [58]. Weiterhin bewirkt es eine verstärkte Stabilität der Proinsulin-mRNA und aktiviert die Proinsulinbiosynthese [59]. Es agiert als sogenannter Glukosekompetenzfaktor in Betazellen [60]. Die Vermittlung der positiven Wirkung von GLP-1 am Insulinpromotor erfolgt unter anderem über das CRE-Element (cyclic AMP response Element), ist aber nicht darauf beschränkt [57]. GLP-1 aktiviert die PDX-1-Genexpression [61], [19], [62], [53]. Gleichzeitig stimuliert es den glukosevermittelten Anstieg des Transaktivierungspotentials von PDX-1 und die darauffolgende Stimulation der Insulinentranskription [62], da die Effekte von Glukose auf das Insulingen durch

PDX-1 über das FarFlat (A3/A4)-Element am Insulingenpromotor vermittelt werden. GLP-1 führt somit zur Stimulation der Insulingentranskription sowohl über das CRE-Element, als auch über einen CRE-unabhängigen, aber glukoseabhängigen Weg, der über PDX-1 vermittelt wird [62]. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen werden die insulinotropen Effekte von GLP-1 abgeschwächt, wodurch Hypoglykämien vermieden werden. Man kann somit sagen, dass GLP-1 zum einen abhängig von Glukose ist, andererseits aber nötig ist, damit Betazellen adäquat auf Glukose reagieren können. Zu dem Hormon Leptin, welches die Insulinsekretion und Insulingenexpression hemmt [63], wirkt GLP-1 antagonistisch. Da die adipoinsulinäre Achse zwischen Leptin (Fettgewebe) und Insulin (Betazelle) und die enteroinsulinäre Achse zwischen GLP-1 (Intestinum) und Insulin (Betazelle) parallel verlaufen, verdeutlicht eine Störung in einer der beiden Achsen die antagonistischen und sich gegenseitig kontrollierenden Effekte der beiden Hormone [55].

### **1.3.4 Molekulare Regulation der Proliferation der Betazellen im endokrinen Pankreas**

In den Langerhansinseln erfolgt ein regelmäßiger Zellumsatz, der die Apoptose und Neogenese der Betazellen umfasst [64]. Die Neogenese der Betazellen erfolgt zum einen durch die Proliferation und Differenzierung von gewebsspezifischen Vorläuferzellen, die in den Ausführungsgängen des exokrinen Pankreas lokalisiert sind („duktale Stammzellen“). Aber auch die differenzierten Betazellen besitzen die Fähigkeit in gewissem Maße zu proliferieren. Die molekularen Mechanismen der Neogenese der adulten Betazellen sind bisher nicht vollständig geklärt, man nimmt aber an, dass sie in ähnlicher Weise gesteuert wird wie die Organogenese des endokrinen Pankreas in der Embryonalzeit [65], [66]. Hierbei wurde durch entwicklungsbiologische Untersuchungen und gezielte Geninaktivierung (knockout) eine Reihe von Molekülen identifiziert, die bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählen Transkriptionsfaktoren (PDX-1, BETA2/NEURO D, Pax-6, Pax-4, Isl-1, Nkx 6.1, Nkx 2.2, Lim, HNF3 $\beta$ , HNF $\gamma$ , HNF1 $\alpha$ , Brn-4, Hb9, Neurogenin, Hes, Cdx-2/3, Prox-1), Wachstumsfaktoren (Reg, IGF-I, IGF-II, Activin A, Betacellulin, HGF, VGEF), Hormone (Insulin, GLP-1, Exendin, GH, Prolaktin, TRH, Gastrin), Nährstoffe



(Glukose, Fette) sowie Signaltransduktionsmoleküle (MAPK-p38, CDK, FGF, Notch, RBPJ $\kappa$ ).

Eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung und Funktion des Pankreas hat der Transkriptionsfaktor PDX-1. Bei homozygoten Mutationen in dem für PDX-1 kodierenden Gen entwickelt sich sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell (knockout) eine Pankreasagenesie [67], [68]. Bei rein inselspezifischer PDX-1-Genausschaltung entwickeln sich eine verringerte Betazellmasse als auch ein Diabetes [68]. Die autosomal-dominant vererbte heterozygote PDX-1-Mutation führt dagegen zum „Maturity onset diabetes of the Young“ (MODY-4) [69]. Im Tiermodell ist der Anstieg der Proliferation der Pankreasgangzellen mit der PDX-1-Expression assoziiert [70]. Um jedoch eine adäquate Proliferation der Pankreasgangzellen zu vermitteln, wurde die Komplexbildung von PDX-1 mit den Homeodomainproteinen PBX [71] und MSX-2 [72] nachgewiesen.

Das insulinotrope Hormon GLP-1 stimuliert die Expression von PDX-1 und führt gleichzeitig zu einer Expansion von Inselzellen im Pankreas der Maus [19]. Über einen Signaltransduktionsweg, bei dem die Phosphatidylinositol-3-Kinase als auch PDX-1 involviert sind, hat GLP-1 Einfluss auf die Regulation des Insulins und Gene, die am Glukosetransport und -metabolismus beteiligt sind [54]. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass der langwirksame Agonist von GLP-1, Exendin-4, die Regeneration des Pankreas und die Expansion der Betazellen stimuliert, indem es zu einem Anstieg der Betazellneogenese und Proliferation auch der duktaalen Progenitorzellen des Pankreas führt [73]. Einen positiven Effekt übt GLP-1 auch auf die Proliferation von INS-1-Betazellen aus. In diesem Zellmodell wurde nachgewiesen, dass GLP-1 synergistisch mit Glukose die Genexpression von Transkriptionsfaktoren, die bei der Betazellproliferation und Differenzierung involviert sind (c-fos, c-jun, junB, zif-268, nur-77) aktiviert. GLP-1 scheint somit pleiotrophe Effekte auf reife Betazellen und auf deren Vorläuferzellen zu haben [55].

#### **1.4 Das Protein P8**

Das Protein P8 wurde im Rahmen eines differenziellen Genscreenings im Rattenmodell nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis kloniert [74]. Seine Expression ist

nicht organspezifisch, sondern lässt sich auch in einigen anderen Organen wie Speicheldrüsen, Magen, Kolon, Leber, Niere, Lunge, Herz, Duodenum, Jejunum und Ileum nachweisen. Im Pankreas selbst konnte P8 bisher nur in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas nachgewiesen werden; weder in den Pankreasgängen, noch in den Langerhansinseln. Die genaue Funktion des Proteins ist bisher nicht bekannt. Die Überexpression von P8 in verschiedenen Zellkulturmodellen (AR42-J, COS-7, HeLa) führte zu einer signifikanten unspezifischen Zellproliferation [74], [75]. Sowohl im Rahmen der Entwicklung und Regeneration als auch bei zellulärer Schädigung des Pankreas, alles Situationen in denen auch eine verstärkte Zellproliferation vorliegt, wird die Expression von P8 induziert. Bei gesundem und entwickeltem Organ ist diese dagegen stark gedrosselt. Da derartiges Verhalten einigen gut charakterisierter Wachstumsfaktoren sehr ähnlich ist, könnte dies ein Anhaltspunkt dafür sein, dass P8 als potentieller Wachstumsfaktor fungiert [74]. Das Protein in der Ratte ist 80 Aminosäuren groß, und das Gen besteht aus 3 Exons, die durch 2 Introns getrennt werden [74]. Die Spezieshomologie zur Maus beträgt 91 % und 75 % zum Menschen [76]. Im Gegensatz zum Ratten-P8 besteht humanes P8 aus 82 Aminosäuren, weist aber gleiche Charakteristika bezüglich der Expression und Zellproliferation auf. Verschiedene strukturelle Beschaffenheiten des Proteins P8 weisen darauf hin, dass es sich auch um einen potentiellen Transkriptionsfaktor handeln könnte. Transkriptionsfaktoren sind Kernproteine, die durch Ligandenbindung aktiviert werden können, selbst an DNA binden und somit eine Aktivierung oder Inhibition der Transkription bewirken. Bei der DNA-Bindungsdomäne (cis-Element) handelt es sich vorwiegend um eine Basensequenz aus ca. 20 Basenpaaren, meist als palindromische Sequenzen oder gleichartige als Tandem wiederholte Sequenzen. Häufig bei den DNA-Bindungsproteinen anzutreffen sind die Motive „Zinkfinger“, und „Leucin-Zipper“ sowie „Helix-loop-Helix“ Strukturen, welche alle eine DNA-Bindungsdomäne aufweisen und zudem über starke Dimerisierungssignale verfügen. Wie in nachfolgender Abbildung dargestellt, enthält das Protein P8 ebenfalls ein Helix-Loop-Helix-Motiv sowie ein mögliches nukleäres Lokalisationssignal am COOH terminalen Ende, welches vermuten lässt, dass P8 als Kernprotein fungiert [74].



**Abb. 1: Darstellung des Helix-loop-Helix-Motivs von P8. Das mögliche nukleäre Lokalisationssignal ist durch einen Rahmen gekennzeichnet [74].**

Bei humanem P8 konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden kann und in diesem Zustand eine höhere DNA-Bindungs­kapazität aufweist [77], [75]. Weiterhin lässt sich bei P8 eine Strukturhomologie zu Homeodomain Transkriptionsfaktoren erkennen [74]. In nachfolgender Abbildung sind die Aminosäuresequenzen von 9 Transkriptionsfaktoren der Homeodomain-Familie im Vergleich mit P8 dargestellt und die übereinstimmenden Sequenzen hervorgehoben.

Hox-1	K Y L T R A R R V E I A A A L N L N E T Q V K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	Q K K R	70
GBX-2	K Y L S L T E R S Q I A H A L K L S E V Q V K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	W K R K	90
Hox-cad	R Y I T I R R K A E L A A A L G L T E R Q V K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	E R K V	64
EN-1B	R Y I T E Q R R Q T L A Q E L S L N E S Q I K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	I K K A	140
Dax	R Y L T R R R R V E I S Q A L G L T E R Q I K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	L K K E	62
nkch4	K Y L S P A D R D E I A G G L G L S N A Q V I T W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	L K R O	74
Lox2	R Y L T R R R R I E L S H T L Y L T E R Q I K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	E K K E	64
GBX1	K Y L S L T E R S Q I A H A L K L S E V Q V K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	W K P	95
E30	R Y L T E R R R Q Q L S R D L G L T E A Q I K I W	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F Q N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K R A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	I K K A	78
Consensus	5 - - - 2 2 - - - 1 4 8 3 1 9 9 9 9					
rat P8	R - K R E A A A N T N R P S P G G H E R K L L T K F Q N S E R K K A A R 80					

**Abb. 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen von neun Homeobox-Transkriptionsfaktoren mit Ratten-P8. Übereinstimmende Sequenzen sind durch einen Rahmen hervorgehoben [74].**

Charakteristische Ähnlichkeiten wurden ebenfalls zu „high mobility group“-Proteinen (HMG) festgestellt, insbesondere zur Familie der HMG-I/Y-Proteine, wobei nur eine geringe Strukturhomologie (35 %) besteht [77]. HMG-Proteine sind Kernproteine, welche im Rahmen der Genregulation für die Erkennung und Modulierung der DNA und Chromatinstruktur verantwortlich sind, die Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an die DNA regulieren und deren Bindung erleichtern [78]. Untersuchungen am Maus-P8-Promotor belegen, dass in der 5'-Region des Promotors mehrere mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem Oct-1, NF- $\kappa$ B, CREB, SP1, und Myc, liegen. Von großer Bedeutung für die Basalaktivität des Promotors ist die Position -111. An dieser Stelle liegt ein cis-aktivierendes Element, an das

C/EBP-Proteine und andere transaktivierende Faktoren binden, welche einen positiven Einfluss auf die Promotoraktivität und somit die P8-Expression ausüben [76]. C/EBP-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die einige Akut-Phase-Proteine regulieren und bei der Entwicklung, Proliferation und funktionellen Differenzierung von Zellen eine hohe Aktivität zeigen [79], [80]. Es wird angenommen, dass die intrazelluläre Konzentration an C/EBP- $\alpha$ , welches die stärkste Affinität aufweist, als positiver Modulator der P8-Expression fungiert. Diese Funktion wurde auch ohne direkte DNA-Protein-Interaktion beobachtet, indem es vermutlich durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Promotoraktivierung kommt [76]. Da in einigen Modellen der akuten Pankreasschädigung eine sofortige P8-Expression induziert wird [81], [74] und sowohl in-vitro als auch in-vivo Lipopolysaccharide, welche bekannt für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bei entzündlichem Geschehen sind, die Expression von P8 induzieren [82], wäre die Funktion von P8 als Akut-Phase-Protein ebenfalls denkbar. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte die Expression von P8 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von Pankreaskarzinomzellen lokalisiert werden [83]. Weiterführende Untersuchungen zeigten hierbei eine signifikant inverse Korrelation zwischen der P8-Expression und Apoptose der Pankreaskarzinomzellen, wobei sich keine signifikante Korrelation bezüglich der Überlebensrate nachweisen ließ [84]. Im Tiermodell für spontane chronische Pankreatitis (WBN/KOB-Ratten) stellt sich ebenfalls eine gesteigerte P8-Expression in den intakten Azinuszellen dar, aber nicht in den apoptotischen Zellen, so dass eher eine antiapoptotische Funktion von P8 angenommen werden kann [85].

Nach den bisherigen Erkenntnissen lassen sich keine genauen Aussagen über die Funktion und charakteristischen Eigenschaften des Proteins P8 treffen. Anhand des aktuellen Wissensstandes lässt sich aber vermuten, dass P8 ein potentieller Transkriptionsfaktor sein könnte, dessen Expression sich aufgrund der Untersuchungen bezüglich der Expression bei der Pankreasregeneration, Pankreasentwicklung, Pankreasschädigung und dem Pankreaskarzinom mit mitogener Aktivität vereinbaren ließe.

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der molekulargenetischen Charakterisierung des proliferationsassoziierten Proteins P8. Einen wichtigen Aspekt stellt hierbei die Fokussierung auf die Regulation der Expression des Proteins in den Zellen des endokrinen Pankreas dar. Des Weiteren wird die funktionelle Auswirkung der P8-Expression in insulinproduzierenden Betazellen betrachtet. Durch die molekulargenetische Charakterisierung des proliferationsassoziierten Proteins P8 hinsichtlich seiner Funktion in insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas trägt die Arbeit zur Entwicklung neuer Therapiestrategien des Diabetes mellitus bei.

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

15-ml-Röhrchen	Becton Dickinson
50-ml-Röhrchen	Becton Dickinson
6-well-Platten	Becton Dickinson
96-well-Platten	Greiner-Labortechnik
Autoklav	Melag
Automatische Pipetten	Eppendorf
Beater	Hamilton Beach
Blot-Apparatur (Multiphor II)	Pharmacia Biotech
Brutschrank	Memmert
Cryo-Röhrchen	Greiner
Digitalkamera	Kodak
Einmalhandschuhe	Safeskin
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer horizontal	Biorad
Elektrophoresekammer vertikal	Biorad
Elektroporator	Biorad
Entwickler (Optimax)	Protec
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100)	Zeiss
Fotomaterial	Kodak
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Genheimer
Glaskügelchen (0,1mm)	Roth
Glaswaren	Schott
Heizblock	Liebisch
Klarsichtfolie	Melitta
Kühlschrank	Bosch
Lichtmikroskop	Hund

Luminometer (System L 400)	Nichols Institute
Luminometer-Reaktionsgefäße (5 ml)	Sarstedt
Magnetrührer	Hartenstein
Mikrowelle	Siemens
Nitrozellulosemembran	Millipore
Objektträger	Marienfeld
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Gefäße	Hartenstein
PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 9700)	Perkin Elmer
pH-Meter	Hartenstein
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Brand
Pipettenspitzen	Brand
Plastikschalen	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße	Greiner
Säulen (GST)	MoBiTec
Schüttelinkubator	Bühler
Sequenzierer (ABI 310)	Perkin Elmer
Sterile Arbeitsbank	Heraeus
Sterile Einmalfilter	Schleicher und Schuell
Speed-Vac	Heto
Spektralphotometer (MR5000)	Dynatec
Thermomixer	Eppendorf
Tris-Tricine-Gele	Biorad
UV-Küvetten	Eppendorf
UV-Lampe	Hartenstein
Vibrofix	Janke und Kunkel
Waage	Kern
Wasserbad-Inkubator	Kötterman
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson
Zellkulturschalen	Becton Dickinson
Zellschaber	Hartenstein

Zentrifugen

Beckman, Eppendorf, Hettich

## 2.2 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen, wenn nicht anders angegeben:

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

BECTON DICKINSON

BIORAD

CALBIOCHEM

GIBCO

MERCK

ROTH

SIGMA

## 2.3 Enzyme

Calf intestine alkalische Phosphatase (CIAP)

PROMEGA

DNase 1

BOEHRINGER

Ex-Taq-Polymerase

TAKARA

Proteaseinhibitor (Trasylol)

GIBCO

Restriktionsenzyme

(Eco RI, Eco RV, Hind III, Kpn I, Xba I, Xho I)

PROMEGA

RNase-Inhibitor

PROMEGA

Superscript™ II

GIBCO

T4-Ligase

PROMEGA



## 2.4 Verwendete Laborkits

Advantage HF™ PCR Kit	CLONTECH
Auto-Seq™ G-50	AMERSHAM
Mercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA	MERCODIA
QIAquick Gel Extraction Kit™	CLONTECH
Rapid Pure Mini-Monster Prep (RPM 4G)™	BIO 101
Rapid Pure Miniprep Kit (RPM)™	BIO 101

## 2.5 Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden beschrieben und wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt.

## 2.6 Bakterienstämme

<b>E. coli-Stamm</b>	<b>Genotyp</b>
BL-21	<i>E.coli</i> B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal</i>
JM 109	<i>e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>) recA1 endAA1 gyrA96 thi-1-hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>+</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 Δ(lac-proAB)</i>
MC1061/P3	<i>araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK ΔlacX74 hsdR2 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) rpsL(STr)thi-1mcrB (P3: amber amp<sup>r</sup>, amber tet<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>)</i>
XL-1-blue MR	<i>Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i>

## 2.7 Medien und Nährböden

Die Zusätze für die Medien werden in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und autoklaviert.

### LB-Medium (pH 7,5)

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

Für die Herstellung von Agarplatten werden dem Medium vor dem Autoklavieren 12 g/l Agar zugesetzt. Die Platten werden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### Antibiotikazusätze für Medien und Agarplatten

Für antibiotikahaltige Agarplatten und Nährmedien werden die entsprechenden Antibiotika nach Abkühlung des Mediums bzw. Agars auf ca. 45 °C hinzugesetzt. Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1:

Antibiotikum	Konzentration (µg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	40, 100	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Tetrazyklin	10	70 % Ethanol

## 2.8 Zelllinien

INS-1	Betazelllinie des endokrinen Pankreas der Ratte (Wollheim, Genf)
AR42-J	Tumorzelllinie des exokrinen Pankreas der Ratte (ATCC)
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie des Affen (ATCC)

## 2.9 Medien für die Zellkultur

### Medium für INS-1-Zellen

RPMI 1640	85,7 %
Glutamin	1 %
FCS (hitzeinaktiviert)	10 %
Na-Pyruvat	1,1 %
Hepes-Puffer	1,1 %
β-Mercaptoethanol	0,1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %

### Medium für stabile INS-1-Zellen

#### INS-1-Zellkulturmedium

G-418-Sulfate	0,1 mg/ml (gelöst in Hepes-Puffer 1:10 verdünnt mit H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )
Hygromycin	0,01 %

### Einfrriermedium für INS-1-Zellen

INS-1-Zellmedium	83 %
FCS	10 %
DMSO	7 %

### Medium für COS-7-Zellen

DMEM (mit L-Glutamin)	89 %
FCS	10 %

Penicillin / Streptomycin 1 %

### **Einfriermedium für COS-7-Zellen**

COS-7-Zellkulturmedium 80 %

FCS 10 %

DMSO 10 %

### **Medium für AR42-J-Zellen**

DMEM (mit L-Glutamin) 79 %

FCS 20 %

Penicillin / Streptomycin 1 %

### **Einfriermedium für AR42-J-Zellen**

FCS 90 %

DMSO 10 %

## **2.10 Plasmide**

### **Plasmid**

### **Eigenschaften**

rp8pCR II TOPO

pCR II-TOPO-Vektor mit Expression von rp8 in der „multiple cloning site des *lacZ*-Gens (4,3 kb); Amp<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>

pcDNA 3.1+

eukaryotischer Expressionsvektor (5,4 kb); Amp<sup>r</sup>, Neo<sup>r</sup> (INVITROGEN)

rp8pcDNA3.1+	eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von rp8 (5,8 kb); Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> (diese Arbeit)
pcDNA I	eukaryotischer Expressionsvektor (4,0 kb); supF-Gen (INVITROGEN)
rp8pcDNA I	eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von rp8 (4,4 kb); supF-Gen (diese Arbeit)
	pCR2.1 TOPOpCR 2.1 TOPO-Vektor (3,9 kb) mit einer „multiple cloning site“ im <i>lacZ</i> -Gen; Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> (INVITROGEN)
mp8pCR 2.1 topo	pCR 2.1 TOPO-Vektor mit Expression von mp8 in der „multiple cloning site des <i>lacZ</i> -Gens (4,2 kb); Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> (diese Arbeit)
pGEXKG	GST-Vektor (5,0 kb) zur Expression von Fusionsproteinen mit GST, welche der Kontrolle des tac-Promotors unterliegen (STRATAGENE)
rp8pGEXKG	GST-Vektor zur Expression des p8-GST-Fusionsproteins (5,4 kb) unter Kontrolle des tac-Promotors (diese Arbeit)

## 2.11 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* bezogen.

Der für die Reverse Transkription verwendete Primer Oligo (dT)<sub>12-18</sub>, (0,5 µg/µl) wurde von der Firma *GIBCO BRL* bezogen.

## Primersequenzen für die PCR

P8-1

5`-CCA GGT ATG ATG GCC ACC TTG CCA CCA AC-3`

P8-a

5`-GGT GTG GTG TCC GTG GTC TGG CCT CAT CTC C-3`

mP8-1

5`CTA GGC ATA ATG GCC ACC TTG GCC ACC AA-3`

mP8-a

5`-GGT GTG GTG TCT GTG GTC TGG CCT TAT TC-3`

hP8-1

5`-CCA GGC ACG ATG GCC ACC TTC CCA CCA G-3`

hP8-a

5`-GCC TCA TCT CCA GCT CTG TCT CAG CGC CC-3`

ract-1

5`-TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC-3`

hract-a

5`-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3`

PDX-1

5`-TGC TAA TCC CCC TGC GTG CCT GTA-3`

PDX-a

5`-CTC CTC CGG TTC TGC TGC GTA TGC-3`

qINS-1

5`-CCT GCC CAG GCT TTT TGT CA-3`

qINS-a

5`-GGT GCA GCA CTG ATC CAC AAT G-3`

## **Primersequenzen für die DNA-Sequenzierung**

M13 r (Reverse Primer)

5`-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3`

T7 (Forward Primer)

5`-CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3`

### **2.12 Größenmarker**

#### **DNA-Größenmarker (GIBCO)**

100 bp DNA-Marker (0,1 µg/µl): Fragmentgröße von 100 bp – 2072 bp

1 kbp DNA-Marker (0,1 µg/µl): Fragmentgröße von 201 bp – 12.216 bp

#### **Protein-Größenmarker (GIBCO)**

Low-range-Proteinmarker (1mg/ml): Fragmentgröße von 14,3 kD – 200 kD

### **2.13 Antiserum**

#### **Primärintiserum**

P8-Antiserum

diese Arbeit





Die Zellen wurden mit FCS-haltigem Medium vom Boden abgespült und in einem 50 ml - Falcon Röhrchen mittels Zentrifugation (1200 rpm, 2 min) pelletiert. Durch das FCS wurde die Reaktion des Trypsins gestoppt. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und auf neue Schalen bzw. Flaschen verteilt.

### **3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei 100 %iger Konfluenz nach dem Absaugen des Zellkulturmediums einmal mit PBS gewaschen, abtrypsinisiert und pelletiert (1200 rpm, 2 min). Die Zellen wurden in entsprechendem DMSO-haltigem Einfriermedium vorsichtig resuspendiert, wobei pro 10 cm - Platte 2 ml Medium verwendet wurden. Anschließend wurde je 1 ml bei 4 °C in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Die gut verschlossenen Cryo-Röhrchen wurden zum schonenden Einfrieren eine halbe Stunde bei 4 °C belassen, anschließend zwei Stunden bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde das Cryo-Röhrchen kurz in ein 37 °C - Wasserbad gehalten. Nach Abreiben des Röhrchens unter der Sterilbank mit 70 % Ethanol wurde die Zellsuspension in eine mit Zellkulturmedium gefüllte Zellkulturschale überführt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium erneuert.

### **3.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Für bestimmte Versuchsansätze war es nötig, die genaue Zellzahl zu bestimmen. Hierzu wurden die Zellen gewaschen, abtrypsinisiert, pelletiert und in einer bestimmten Menge Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 30 µl unter Verwendung einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der Mittelwert der in den 4 Quadranten gezählten Zellen musste mit 10.000 multipliziert werden, um die Anzahl der Zellen in 1 ml Medium zu erhalten.

## **3.2 Ribonukleinsäure (RNA) - Extraktion**

### **3.2.1 Extraktion der RNA**

Die Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des Reagenzes TRIZOL in Anlehnung an die von *Chomczynski* entwickelte Single-Step-Methode. Das TRIZOL-Reagenz beinhaltet Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, wodurch die Isolierung der RNA aus Zellen und Geweben ermöglicht wird. Zur Vermeidung eines Abbaus der RNA durch Ribonukleasen (RNasen), ubiquitär vorkommenden Endo- bzw. Exonukleasen sollte möglichst Rnase-frei gearbeitet werden. Dazu werden Einmalhandschuhe getragen, Glaswaren gebacken, Kunststoffmaterialien autoklaviert und die Lösungen mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert. Anfangs erfolgt die Homogenisierung der Zellen. Hierzu werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, 1 ml des Trizol-Reagenzes hinzugefügt, und die Zellen mittels Zellschaber von der Platte gelöst. Nach Überführung der Zellsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß werden diese bei Raumtemperatur (RT) für 10 min inkubiert, um eine komplette Lösung der Nukleoproteinkomplexe zu erreichen. Zur Phasentrennung werden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, die Proben leicht geschüttelt und bei 4 °C 10 min abzentrifugiert. Nachdem die rote Phenol-Chloroform-Phase und die klare wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist, sich voneinander getrennt haben, wird die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach Mischen der Probe und Inkubation bei RT für 15 min wird die RNA durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 min pelletiert. Die RNA wird einmal mit 80 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 30 µl Rnase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgt bei –80°C.

### **3.2.2 DNase 1-Verdau der Ribonukleinsäure**

Um mögliche DNA-Reste nach der RNA-Extraktion zu entfernen, werden die Proben mittels DNase I verdaut.

Maximale RNA-Menge	50 µg
RNase-Inhibitor (40 U)	0,25 µl
DNase 1 (Rnase-frei) (10 U)	1 µl
Hepes-Cl, 0,1 M	5 µl
NaCl, 0,5 M	5 µl
MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M	0,76 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 76 µl

Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C werden 50 µl Phenol/Chloroform (3:1) hinzugefügt und 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Hierbei erfolgt wie bereits bei der RNA-Extraktion eine Phasentrennung. Die wässrige RNA-haltige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA erneut zu fällen, werden 5 µl Na-Acetat (3 M) und 200 µl 100 % Ethanol zugegeben und bei –80 °C für 30 min inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgt bei –80 °C.

### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

DEPC 0,01 % (v/v) wird unter Verwendung von Rnase-freien Materialien in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> über Nacht bei Raumtemperatur gelöst und am folgenden Tag autoklaviert.

### **3.2.3 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird unter zu Hilfenahme von UV-Küvetten im Photometer bestimmt. Dazu wird eine 1:100 Verdünnung der zu untersuchenden Probe in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hergestellt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm im entsprechenden RNA- oder DNA-Programm gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gemessen. Zur Ermittlung der Reinheit der Proben wird das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt, das zwischen 1,6 und 2,0 sein sollte. Die Konzentration der Probe wird durch Multiplikation mit dem Faktor 50 (doppelsträngige DNA) oder 40 (RNA) berechnet.

### **3.3 Reverse Transkription / Polymerasekettenreaktion**

#### **3.3.1 Reverse Transkription**

Mit Hilfe der reversen Transkription kann durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) isolierte mRNA in eine komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) umgeschrieben werden, die als Ausgangsmaterial für die Amplifikation (PCR) dient. Hierbei wird ebenfalls ein Primer (Oligonukleotid) benötigt, der mit seiner freien 3'-OH-Gruppe an das Poly-A-Ende der mRNA hybridisiert und somit die DNA-Synthese initiiert. Diese Methode ermöglicht die Analyse der zellulären Genexpression. Zu 1 - 5 µg RNA wird 1 µl Oligo (dT) gegeben, der Ansatz mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 12 µl aufgefüllt und 10 min lang bei 70 °C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis werden pro Ansatz 4 µl First Strand Buffer (5x), 2 µl DTT und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) hinzugefügt und 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase bzw. 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bei den Negativkontrollen, wird der Ansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend für 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die entstandene cDNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine rasche enzymvermittelte in vitro-Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Zu Beginn wird die DNA bei 95 °C in Einzelstränge denaturiert. Anschließend wird die Temperatur soweit gesenkt, dass eine Anlagerung der Oligonukleotide, die zu den Randbereichen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementär sind, möglich ist. Bei 72 °C (1 min je kB zu amplifizierende DNA) erfolgt die Primer-Extension und Amplifikation durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase gewonnen aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus*) unter Verbrauch der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Je nach Sensitivität werden 20 - 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Um noch nicht vollständig synthetisierte PCR-Produkte aufzufüllen,

erfolgt abschließend für 30 s eine Amplifikation bei 72 °C. Ein Teil des Ansatzes wird zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

10x Ex-Taq-Polymerase-Puffer	5 µl
dNTP-Mix	4 µl
Template-DNA	2 µl
Sense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Antisense-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Ex-Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50 µl

Formel zur Errechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,4 (\%GC\text{-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Oligonukleotids}$$

### 3.4 Agarose-Gelelektrophorese der cDNA-Proben

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von großen Nukleinsäuremolekülen (200 bp - 5 kb). Hierbei wird die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Gleichstromfeld zu deren Trennung ausgenutzt. Da Nukleinsäuren aufgrund ihres Zuckerphosphatrückgrats negativ geladen sind, wandern diese zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Ladung, der Molekülgröße und der Konformation. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel netzähnliche Strukturen ausbildet. In wässrigen Lösungen löst sich die Agarose beim Erwärmen und polymerisiert beim Erkalten zu einer Gelmatrix. Die Konzentration der Agarose in der Gelmatrix bestimmt die Schärfe der Auftrennung (0,3 - 3 % vw). Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) hinzugefügt, der sich zwischen die gestapelten Basen schiebt, wodurch die Fluoreszenz im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert wird.

### 3.4.1 Gel, Laufpuffer

Die Analyse der DNA-Proben erfolgt in einem 1,2 % Agarosegel. Hierfür werden 1,2 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst und 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wird das Gel luftblasenfrei gegossen. Die Proben werden mit 10 % 10 x DNA-loading-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts dient ein ebenfalls aufgetragener DNA-Längenmarker. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einer horizontalen Gelkammer bei 100 - 120 V mit 1 x TAE als Laufpuffer. Sobald die Proben weit genug gelaufen sind, wird das Gel unter UV-Licht (254 nm) mit einer Digitalkamera fotografiert.

#### 1 x TAE-Puffer

Tris base	4,84 g
Essigsäure (eiskalt)	1,14 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

#### 10 x DNA-Loading-Puffer

Glycerol	30 %
EDTA (pH 8,0)	0,1 mM
SDS	1 %
Bromphenolblau	0,25 %
Xylene Cyanol	0,25 %

Der Puffer wird steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

### **3.5 Subklonierung**

Klonierung bezeichnet einen Vorgang, bei dem ein DNA-Fragment in ein ringförmiges DNA-Molekül, einen Vektor, eingefügt wird, so dass ein rekombiniertes DNA-Molekül entsteht. Der Vektor dient als Vehikel und kann in einem geeigneten Wirtsorganismus, z. B. in Bakterien, vermehrt werden. Somit ist es möglich, bestimmte DNA-Sequenzen in speziellen Bakterien zu vermehren und anschließend zur weiteren Analyse wieder zu isolieren. Das Prinzip der Subklonierung besteht aus mehreren Schritten. Zunächst wird das gewünschte DNA-Stück aus dem Ursprungsvektor mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen in der „multiple cloning site“ (MCS) liegen, ausgeschnitten. Mit den gleichen Restriktionsendonukleasen wird auch der Empfängervektor linearisiert. Nach Auftrennung der Proben mittels Agarosegelelektrophorese werden die gesuchten DNA-Stücke ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert und mittels T4-Ligase ligiert. Nun wird das ligierte Plasmid durch Hitzeschock in kompetente Bakterien transformiert und anschließend auf einem mit Antibiotikum versetztem Agar ausplattiert. Die Selektion erfolgt dadurch, dass die transformierten Bakterien ein Resistenzgen für ein spezielles Antibiotikum enthalten und somit auf dem Agar wachsen können, im Gegensatz zu den nicht transformierten Bakterien. Nach Inkubation der Agarplatten bei 37 °C werden gewachsene Kolonien in flüssiges Kulturmedium überführt und durch weitere Inkubation in der gewünschten Menge vermehrt. Zur Überprüfung der Kolonien erfolgt eine Plasmidpräparation, wodurch die Plasmide aus den Bakterien eluiert werden, und ein für das Insert spezifischer Restriktionsverdau. Zur weiteren Verwendung wird eine Plasmidpräparation im größeren Maße angefertigt und ein Glycerolstock zur längeren Aufbewahrung erstellt.

#### **3.5.1 Restriktion**

Sowohl der Ursprungsvektor, der das gewünschte DNA-Fragment enthält, wie auch der Empfängervektor, wurden mit speziellen Restriktionsendonukleasen nach folgendem

Schema verdaut. Hierdurch wurde das Insert ausgeschnitten und der Empfängervektor linearisiert.

DNA (20 µg)	
Reaktionspuffer (10 x)	2 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µl
Restriktionsenzyme (10 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 20 µl

Die Restriktion erfolgte für 1 - 3 h bei 37 °C.

### **3.5.2 Agarosegelelektrophorese**

Durch Agarosegelelektrophorese wurde die verdaute DNA aufgetrennt. Hierzu wurden zur Kontrolle einerseits nur 0,5 µg DNA jeder Probe aufgetragen und bei positivem Ergebnis die verbleibende DNA-Menge. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Proben wurde das zu isolierende DNA-Fragment sorgfältig, mit möglichst wenig Agarose, mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel geschnitten.

### **3.5.3 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Hierfür wurde der QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Nachdem die isolierten DNA-Fragmente in einem vorher austarierten Reaktionsgefäß gewogen worden waren, wurden für jeweils 100 mg des Gels 300 µl Puffer QG zugegeben. In der nachfolgenden zehnminütigen Inkubation bei 50 °C (zwei- bis dreimal vortexen) wurde die DNA an die QIAquick-Membran gebunden. Der pH-Wert muss hierbei kleiner als 7,5 sein, da sonst die Bindung nicht stattfinden kann. Pro 100 mg Gel wurden nun 100 µl Isopropanol hinzugefügt, um die Menge an DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp bzw. größer als 4 kb sind, zu erhöhen. Um die DNA zu binden, wurde das Gemisch für eine Minute bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Folgenden wurde das Pellet mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und wiederum



1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und um das restliche Ethanol zu entfernen, wurde die Zentrifugation wiederholt. Nach Überführung der QIAquick®-Säule in ein neues Reaktionsgefäß, wurde die gebundene DNA mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert. Die gewonnene DNA wurde photometrisch gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.5.4 Ligation

In einem 10 µl Ligationsansatz wurden Insert und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 6:1 mit 1 µl 10 x T4-Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase zusammenpipettiert und über Nacht bei 14 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz bei -20 °C aufbewahrt.

Zur genauen Berechnung des molaren Verhältnisses von Insert zu Vektor verwendeten wir folgende Formel:

$$\text{Menge an Vektor (ng)} \times \text{Größe Insert (kb)} / \text{Größe des Vektors (kb)} \times 3 = \text{Menge an Insert (ng)}$$

### 3.5.5 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach *Nishimura et al. (1990)*. Hierbei wird 1 ml einer bakteriellen Übernachtskultur in 100 ml Medium A überführt und solange bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, bis sie in die mittlere logarithmische Wachstumsphase gelangten (bei *XL-1-blue*, und *MC1061/P3* entspricht dies 0,4 - 0,6 A<sub>590</sub> ). Danach wird die Kultur 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien bei 1500 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. Danach werden 5 ml Medium B zugegeben und vorsichtig gemischt. Die durch die Wachstumsbedingungen kompetent gemachten Bakterien werden in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren. Es ist nicht notwendig, die Bakterien mittels Schockgefrieren einzufrieren, man muss jedoch darauf achten, dass nach dem Zentrifugationsschritt alle weiteren

Arbeitsabläufe vorsichtig und nur mit vorgekühlten Materialien durchzuführen sind. Die kompetent gemachten Bakterien können dann wie unter 3.5.6 und 3.5.7 beschrieben transformiert werden.

### **Medium A**

LB-Medium, supplementiert mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % Glucose

### **Medium B**

LB-Medium, supplementiert mit 36 % Glycerin, 12 % PEG 6000 und 12 mM MgSO<sub>4</sub>

### **LB-Medium**

Bacto-Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### **3.5.6 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock**

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes gemischt. Nach einer weiteren halben Stunde Inkubation auf Eis werden die Bakterien 90 s lang in ein 42 °C-Wasserbad gestellt und danach 2 - 3 min auf Eis abgekühlt. Nach Hinzugabe von 200 µl SOC-Medium inkubieren diese bei 37 °C schüttelnd für 45 min, um die Expression der Antibiotika-Resistenz zu erlauben. Nach der Inkubation werden 100 µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Platte mit geeigneter Menge an Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium, das mit einem geeignetem Antibiotikum versetzt ist, überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C vermehrt. Je 900 µl der Bakterienkultur werden in Einfrierröhrchen mit 900 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

## **SOC-Medium**

Bacto Tryptone	20 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	0,5 g
1 M KCl	2,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen und nach dem Autoklavieren folgendes supplementieren:

- 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 1 M MgSO<sub>4</sub>
- 1 M Glucose

### **3.5.7 Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation**

Nach Auftauen der elektrokompetenten Zellen auf Eis werden sie in eine gekühlte und sterile Küvette überführt und mit 5 µl des Ligationsansatzes gemischt. In einem Elektroporator erfolgt die Transformation durch einen einmaligen Elektroschock mit 2,5 kV. Anschließend werden 500 µl 37 °C warmes SOC-Medium hinzugefügt, die Bakteriensuspension in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert und nach Inkubation bei 37 °C in einem Schüttelinkubator für 60 min werden die Bakterien auf antibiotikaversetzten Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium, das mit einem geeignetem Antibiotikum versetzt ist, überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C vermehrt. Je 900 µl der Bakterienkultur werden in Einfrierröhrchen mit 900 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

### **3.5.8 Plasmidpräparation**

Kleine Plasmidmengen (Minipräp) wurden aus 5 ml Übernachtskultur präpariert. Hierfür wurde der Rapid Pure Miniprep Kit von BIO 101 verwendet. Größere Plasmidmengen

wurden aus einer 1 l Übernachtkultur mit dem Mini-Monster-Präp von BIO 101 präpariert. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde in Restriktionen, Ligationen, Sequenzanalysen und Transfektionen eingesetzt.

### **3.5.9 Restriktionen zur Überprüfung isolierter Plasmide (Einfach- bzw. Doppelverdau)**

DNA (aus Minipräp)	8 µl
Reaktionspuffer (10 x)	2 µl
BSA (1 mg/ml)	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 20 µl

### **3.6 TOPO-TA-Klonierung**

Die TOPO-TA-Klonierung erfolgte anhand des Protokolls von Invitrogen unter Zuhilfenahme des entsprechenden „Cloning-Kits“. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der TA-Klonierungsvektor am 3'-Ende je ein einzelnes überhängendes Deoxythymidin trägt und dadurch eine effiziente Ligation mit PCR-Produkten, die durch Taq-Polymerase amplifiziert wurden, ermöglicht wird, da diese eine nicht-template-abhängige terminale Transferaseaktivität besitzt und somit am 3'-Ende ein einzelnes überhängendes Deoxyadenosin anfügt. Zusätzlich ist eine Topoisomerase I kovalent an den Vektor gebunden, die den DNA-Doppelstrang an spezifischen Stellen bindet und das Phosphodiester-Rückgrat nach dem 5'-CCCT (überhängendes Ende) in Einzelstränge schneidet. Hierbei entsteht eine energiereiche Bindung zwischen der Topoisomerase und dem 3'-Phosphatende, die durch Ligation wieder aufgehoben wird.

### 3.7 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der DNA-Nukleotid-Sequenz erfolgte unter Verwendung der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach *Frederik Sanger*. Hierbei wird einzelsträngige DNA in 4 Ansätze verteilt, ein Gemisch aus den 4 Deoxyribonucleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) hinzugegeben und ein zu dem 3'-Ende komplementärer Primer, der mit einem jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Nach Zugabe der Dideoxyribonucleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) wird ein komplementärer Strang durch die DNA-Polymerase synthetisiert. Sobald ein Dideoxyribonucleosidtriphosphat anstelle eines normalen Nukleotids eingebaut wird, erfolgt der sequenzspezifische Kettenabbruch, da keine freie 3'-OH-Gruppe für die Polymerisierung mehr vorhanden ist. Nach Beendigung der Reaktion werden die 4 Ansätze vereinigt, und die Synthesestrangfragmente auf einer Spur des Sequenziergels nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Mittels eines speziellen Laser-Fluorometers wird die Fluoreszenz der einzelnen Bruchstücke vermessen. Die komplementäre Basensequenz kann direkt abgelesen werden. 500 - 1000 ng der zu sequenzierenden DNA werden mit 8 µl Big-Dye-Mix® und je 1 µl der spezifischen Primer (3,3 pg/µl) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzreaktion erfolgt nach einer Denaturierung bei 96 °C über 5 min als Polymerasekettenreaktion mit 25 Zyklen (Denaturierung: 30 s, 96 °C; Annealing: 15 s 50 °C; Extension: 4 min 60 °C) und abschließender Extension bei 60 °C. Um die Sequenzreaktion von unverbrauchten PCR-Reagenzien zu befreien, wird die DNA unter Verwendung des *Auto-Seq™G-50-Protokolls* über Säulen gereinigt. Anschließend erfolgt eine Fällung der DNA mittels Na-Acetat. Hierzu wird das Probenvolumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 0,1 % (v/v) Na-Acetat (3 M) sowie die 2,5 fache Menge an ETOH (100 %) hinzugefügt. Nach gutem Durchmischen der Probe und 30 min Fällung bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch bei 15000 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet kurz getrocknet. Nach Hinzugabe von 250 µl ETOH (70 %) wird die Probe erneut bei 15000 U/min für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in der Speed-Vac getrocknet. Dieses wird anschließend in 25 µl Template Suppression Reagent (TSR) resuspendiert, und nach Überführung der Probe

in ein Sequenzierreaktionsgefäß erfolgt eine Inkubation bei 96 °C für 2 min und Abkühlung auf Eis für weitere 2 min. Die Sequenz wird nun im Sequenzer ABI 310 (PERKIN ELMER) ermittelt.

### **3.8 Luciferase-Reportergenassay**

Das Prinzip des Luciferase-Reportergenassays besteht aus mehreren Komponenten. Zuerst erfolgt eine Transfektion von Zellen, was die Einschleusung von DNA in höhere Zellen ermöglicht. Hierbei gibt es mehrere Möglichkeiten, zum einen die transiente Transfektion, bei der die in die Wirtszelle eingeschleuste DNA nur vorübergehend aktiv ist und im Laufe mehrerer Zellteilungen wieder verloren geht. Die DNA wird somit nicht ins Genom der Empfängerzelle eingebaut und kann sich auch nicht extrachromosomal vermehren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eine transiente Kotransfektion durchzuführen, bei der mehrere Gene bzw. DNA-Konstrukte in die Zelle eingefügt werden. Hierbei wird ein Reportergenkonstrukt verwendet, das aus einem Promotorkonstrukt und dem Luciferasegen als Reportergen besteht. Durch Aktivierung des Promotors, ein DNA-Sequenzbereich, von dem die Transkription eines Gens ausgeht, wird das Luciferasegen ebenfalls mitaktiviert, und es erfolgt eine enzymkatalysierte Chemilumineszenz, bei der Luciferol durch die Luciferaseaktivität in Luciferin umgewandelt wird, das die Ausgangssubstanz für lichtemittierende Produkte bildet. Dieses kann in einem Luminometer gemessen werden.

#### **3.8.1 Transfektion in INS-1-Zellen, COS-7-Zellen und INS-1-Stables**

Zur Transfektion wurden die Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und bei 50 % Konfluenz kotransfiziert. Die Liposomen-vermittelte Transfektion wird mit Hilfe von Lipofectamine-Reagenz, einer 3:1 Mischung der polykationischen Lipide DOSPA und DOPE, durchgeführt. Die Transfektion erfolgt in Zellkulturmedium ohne FCS. Pro Platte wurden 8 µl Lipofectamin und 2 µg Luciferase-Reportergen-Konstrukt in je 300 µl Transfektionsmedium verdünnt. Bei den COS-7- und den INS-1-Zellen wurde eine Kotransfektion durchgeführt und zusätzlich noch 10 - 15 µg eines P8-

Expressionsvektors hinzugefügt. Die Lösungen wurden vereinigt und zur Ausbildung von Liposomen-DNA-Komplexen 40 min bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen mit serumfreiem Transfektionsmedium gewaschen worden waren, wurden 2,4 ml Transfektionsmedium zugegeben und die Transfektionslösung vorsichtig hinzupipettiert. Nach Inkubation von 6 - 8 h wurde die Transfektionslösung entfernt und die Zellen mit serumhaltigem Medium für maximal 72 h inkubiert. Die stabilen INS-1-Zellen wurden alle 12 h mit 5 mM IPTG stimuliert, um eine P8-Überexpression zu erhalten.

### **3.8.2 Gewinnung der Zellextrakte**

Die transfizierten Zellen werden mit PBS gewaschen und durch Hinzufügen von 350 µl Extraktionspuffer unter Verwendung eines Zellschabers geerntet und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach 10 - 20 s vortexen werden die Zellfragmente bei 12000 g für 5 min pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung können die Zellextrakte bei -20 °C gelagert werden.

#### **Extraktionspuffer**

Gly-Gly-Puffer

1 % Triton

1 mM DTT

#### **Gly-Gly-Puffer**

25 mM Gly-Gly

15 mM MgSO<sub>4</sub>

4 mM EGTA

### **3.8.3 Messung der Luciferaseaktivität nach Transfektion**

Die Luciferase-Messung erfolgte im Luminometer. In für das Gerät geeigneten Reaktionsgefäßen werden je 185 µl Assay-Mix vorgelegt und je 50 µl Proteinextrakt hinzupipettiert (Doppelbestimmung). Die Proben werden im Gerät platziert, und unter Verwendung einer bestimmten Luciferin-Lösung, von der das Luminometer 300 µl pro Ansatz ansaugt, wird die Luciferaseaktivität gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wird nach Bradford bestimmt.

#### **Assay-Mix**

Gly-Gly-Puffer

100 mM Potassium Phosphate

100 mM DTT

100 mM ATP

#### **Luciferin-Mix (vor Licht schützen)**

1 mM Luciferin

Gly-Gly-Puffer

## **3.9 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)**

### **3.9.1 Probenvorbereitung**

Nachdem die Zellen in 6-well-Zellkulturschalen gesplittet worden sind (pro well 150000 Zellen), werden sie am folgenden Tag mit speziellem Medium (Zellkulturmedium für stabile INS-1-Zellen mit nur 2,5 mM Glukose und 18 ml FCS) gefüttert. Zur P8-Überexpression werden die Zellen mit 5 mM IPTG Endkonzentration alle 12 h stimuliert. Nach der entsprechenden Stundenzahl wird das Medium der Zellen entnommen und bei -80 °C bis zur Messung aufbewahrt. Die Zellen werden nun mit



1 ml eines ETOH-H<sub>2</sub>O-HCl-Gemisches (750 : 235 : 15) überschichtet und bei 4 °C gelagert. Nach 12 h werden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, abzentrifugiert und ebenfalls bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

### **3.9.2 Messung**

Für die Bestimmung der Insulinkonzentration der Proben wird ein kommerziell erhältlicher Kit (Mercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA) verwendet. Die Tests beruhen auf der sogenannten Sandwich-Technik. Dabei bindet das Insulin an einen an der Oberfläche der Löcher (96) verankerten anti-Insulin-Antikörper. Durch die anschließende Bindung eines peroxidasekonjugierten anti-Insulin-Antikörpers an das Insulin wird das sogenannte Sandwich hergestellt. Durch mehrfaches Waschen werden alle ungebundenen enzymgekoppelten Antikörper entfernt. Das Enzym des Konjugats reagiert schließlich mit einem zugegebenen Substrat unter Bildung eines Farbstoffes, durch Zugabe von Säure wird die Reaktion gestoppt. Die spektralphotometrische Bestimmung der Absorption bei einer vom Farbstoff abhängenden Wellenlänge dient unter Zuhilfenahme einer hergestellten Eichkurve der Ermittlung der Insulinkonzentration.

## **3.10 Generierung eines P8-Antiserums**

### **3.10.1 Klonierung eines P8-GST-Fusionsproteins**

Zur Erstellung eines P8-GST-Fusionsproteins wird ein pGEX-Vektor verwendet. Dieser Vektor enthält die Glutathion-S-Transferase (GST, 26 kD), so dass Proteine als Fusionsproteine exprimiert werden. Das GST-Gen unterliegt der Kontrolle des tac-Promotors. Dadurch kann durch IPTG-Induktion eine spezifische Expression des Fusionsproteins erreicht werden. Zur Expression wird dieser Vektor in proteasedefiziente E.coli BL 21 transformiert, die eine optimale Expression von rekombinanten Proteinen ermöglichen. Somit erfolgt eine kontrollierte Expression dieses GST-Fusionsproteins in BL 21. Nach Vermehrung und Lyse der Bakterien ist es

möglich, das Fusionsprotein von den anderen Proteinen zu trennen, indem es an Glutathion-Sepharose bindet und die übrigen Proteine durch Waschvorgänge entfernt werden. Anschließend wird das Fusionsprotein durch reduziertes Glutathion von der Glutathion-Sepharose getrennt und eluiert.

Die Klonierung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie unter 3.5 beschrieben. Hierzu wird der Vektor pGEXKG unter Verwendung einer Restriktionsendonuklease aufgeschnitten und linearisiert. Da das Insert nicht mit der gleichen Restriktionsendonuklease ausgeschnitten wird, werden sowohl das DNA-Fragment wie auch der linearisierte Vektor zusätzlich 30 min bei 37 °C mit Klenow-Polymerase und Oligonukleotiden inkubiert, um die überhängenden Enden aufzufüllen.

10 x Klenow-Puffer	5 µl
10 mM dNTP	5 µl
Restriktionsverdau	20 µl
Klenow-Polymerase	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50 µl

Der linearisierte Vektor wird zusätzlich bei 70 °C für 15 min inkubiert und nach Hinzugabe von 2 µl „calf intestine alkalische Phosphatase“ (CIAP), 10 µl dazugehörigen Puffer (CIAP-Puffer) und 38 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgt bei 37 °C und 56 °C für jeweils 15 min und nach erneuter Hinzugabe von 2 µl CIAP wird dieser Temperaturzyklus wiederholt. Alle weiteren Schritte der Subklonierung (Agarosegelelektrophorese, Gelextraktion, Ligation, Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung) erfolgen wie unter 3.4, 3.5 und 3.7 beschrieben.

### **3.10.2 Bakterielle Expression des P8-GST-Fusionsproteins**

#### **3.10.2.1 Bakterienwachstum und Induktion**

Um das Wachstum zu beschleunigen, ist es sinnvoll, eine Vorkultur von 5 ml LB-Medium mit Ampicillin mit dem P8-GST-Fusionsprotein zu beimpfen und über Nacht unter Schütteln wachsen zu lassen. Am darauffolgenden Tag werden 2 Liter mit

Ampicillin versetztes LB-Medium mit der Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Sobald eine optische Dichte von 0,6 erreicht ist, werden die Bakterien mit 1 mM IPTG 4 Stunden bei 30 °C unter Schütteln stimuliert und anschließend bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Ab diesem Schritt ist es wichtig, die Probe immer kühl zu halten. Nachdem das Bakterienpellet einmal mit 20 ml Pellet-Waschpuffer gewaschen worden ist, wird es erneut bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Menge des Bakterienpellets muss nun abgeschätzt werden, um somit einen Richtwert zur späteren Beladung der Glutathion-Sepharose-Säule zu haben.

### **3.10.2.2 Bakterienlysate**

Nun wird das Pellet in ca. 5 ml Extraktionspuffer gelöst, in ein mit Glaskügelchen zur Hälfte gefülltes Schraubgefäß überführt und mit Extraktionspuffer aufgefüllt. Nachdem das Gefäß luftdicht abgeschlossen worden ist, wird es mit einer Eismanschette umhüllt und in einem Beater platziert. Nun erfolgt zehnmal ein zehnständiger Beatvorgang mit je 2 min Kühlen. Nach Überführung des Überstandes in ein 50 ml-Gefäß wird dieser für 15 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Der das Protein enthaltende Überstand wird in ein neues Gefäß auf Eis überführt. Das Pellet wird erneut in Extraktionspuffer resuspendiert, und der Beatvorgang wird wie oben beschrieben wiederholt.

### **3.10.2.3 Proteinelution über die Glutathion-Sepharose-4B-Säule**

Im 4 °C Kühlraum wird eine 12 ml-Säule mit 100 µl Glutathion-Sepharose pro ml Zellpellet, wie oben beschrieben, beladen. Nachdem die Sepharose auf den Säulenboden abgesunken ist, wird diese mit dreimal 1 ml Extraktionspuffer equilibriert. Nun werden die Proteinproben zweimal auf die Säule geladen. Nachdem diese über die Säule gelaufen waren, wurde diese mit 5 fachem Volumen der geladenen Sepharose mit Extraktionspuffer beladen und anschließend mit Waschpuffer 1 (20 faches Volumen der geladenen Sepharose) gewaschen. Nach Waschen der Säule mit Waschpuffer 2 (10 faches Volumen der geladenen Sepharose) werden die Proteine mit Elutionspuffer (4 faches Volumen der geladenen Sepharose) bei Raumtemperatur von der Säule eluiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Kontrolle der Proteinelution wird eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt und diese mit Coomassie-Blau gefärbt.

### **Pellet-Waschpuffer**

Glycerin	1 ml
PMSF (100 mM)	100 µl
PBS	ad 10 ml

### **Extraktionspuffer**

1 x	PBS
200 mM	NaCl
1 %	Triton X-100
PMSF	1 mM
DTT	10 mM

### **Waschpuffer 1**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
600 mM	NaCl
1 mM	DTT

### **Waschpuffer 2**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
300 mM	NaCl
1 mM	DTT

## **Elutionspuffer**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
300 mM	NaCl
5 mM	reduziertes Glutathion
1 mM	DTT
50 %	Glycerol

### **3.10.3 Produktion des Antiserums**

Zur Produktion des Antiserums wurde das erstellte GST-P8-Fusionsprotein der Firma BIOGENES GmbH (Berlin) gesendet. Dort wurden zwei Kaninchen mit dem GST-P8-Fusionsprotein beimpft. Wir erhielten eine Probe des Serums vor Stimulation, 50 ml nach dreimaliger Stimulation und 50 ml nach viermaliger Stimulation.

#### **3.10.3.1 Charakterisierung des polyklonalen P8-Kaninchen-Antiserums**

Die Charakterisierung des polyklonalen P8-Kaninchen-Antiserums erfolgte unter Zuhilfenahme der Western-Blot-Technik. Bei diesem Verfahren werden die Proteinproben mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Träger dient ein hochvernetztes Polyacrylamidgel, das direkt vor dem Lauf durch Polymerisieren von Monomeren hergestellt wird. Die Proteine werden in einer wässrigen Lösung aufgenommen, die das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Dieses bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins und bewirkt somit dessen Entfaltung und Aufhebung der Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden. Durch Hinzugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Konformation bzw. entstandene Proteinkomplexe durch Spaltung der Disulfidbrücken aufgehoben. Bei der Elektrophorese wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine zur Kathode. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrem Molekulargewicht, da kleine Proteine die Poren des Polyacrylamidgels schneller passieren. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden aus diesem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter (Nitrocellulose) übertragen (Blotten). Hierdurch wird eine Kopie des Gels auf dem

Filter erzeugt, wobei die Proteine immobilisiert werden. Das Trennmuster, die Immunreaktivität wie auch die funktionelle Aktivität der Proteine bleiben erhalten. Die auf die Membran transferierten Proteine können nun mit spezifischen Antikörpern reagieren (Immunoblot). Bei der von uns verwendeten indirekten Nachweismethode wird das gebundene erste Antiserum durch ein sekundäres markiertes Antiserum nachgewiesen. Zur Darstellung des markierten Proteins erfolgt die Belichtung eines Röntgenfilms.

### **3.10.3.2 Herstellung von Proteinextrakten**

#### **Ganzellextrakte**

Zur Erstellung der Ganzellextrakte werden die konfluenten Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS in 800 µl RIPA-Puffer gelöst und unter Verwendung eines Zellschabers geerntet. Nach Überführung in ein steriles Reaktionsgefäß werden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt die Lagerung der Proben bei –80 °C.

#### **RIPA-Puffer**

150 mM	NaCl
20 mM	Tris, pH 7,5
1 mM	EDTA
1 %	NP-40
1 %	DOC
0,1 %	SDS
5 mM	NaF
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml
1 Tablette Proteaseinhibitor	
kurz vor Gebrauch:	DTT 1 mM
	PMSF 1 mM

## **Kernextrakte**

Die Methode zur Extraktion von Kernproteinen wurde nach *Schreiber et al.* angewendet. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem 1 x PBS, werden die Zellen unter Verwendung eines Zellschabers mit 1 ml PBS geerntet und in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 1200 g für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand kann nun verworfen werden. Das Pellet wird in 400 µl kaltem Puffer A resuspendiert und für 15 – 20 min auf Eis inkubiert, bis eine Zellschwellung auftritt. Nach Hinzufügen von 25 µl NP-40 (Igepal) werden die Proben für 10 s gevortext. Unter dem Lichtmikroskop wird kontrolliert, ob der größte Anteil der Zellen geplatzt ist. Anschließend werden die Zellen für 30 s abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das die Kerne enthaltende Pellet in 50 µl Puffer C resuspendiert. Nach Inkubation bei 4 °C für 15 min unter ständigem Schütteln, erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt. Während die Kernmembranteile pelletiert werden, befinden sich die Kernproteine im Überstand, der sogleich aliquotiert und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wird.

### **Puffer A (hypoton)**

10 mM HEPES, pH 7,9

10 mM KCL

0,1 mM EDTA, pH 8,0

0,1 mM EGTA, pH 8,0

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 100 ml

Protease-Inhibitor

Aliquotieren und Lagerung bei 4 °C

kurz vor Gebrauch:        DTT    ad 1 mM

                                 PMSF ad 1 mM

### **Puffer C (hyperton)**

20 mM HEPES, pH 7,9

0,4 M NaCl

1 mM EDTA, pH 8,0

0,1 mM EGTA, pH 8,0

20 % Glycerol

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 100 ml

Proteaseinhibitor

Aliquotieren und Lagerung bei 4 °C

kurz vor Gebrauch:        DTT    ad 1 mM

                                 PMSF ad 1 mM

### **3.10.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wird eine 96-well-Platte verwendet, in die je 1 µl der zu messenden Proben mit dem BIORAD-Proteinassay (1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) in einem Gesamtvolumen von 200 µl vermischt werden. Nach Eichung des Spektralphotometers auf das verdünnte Farbstoffreagenz wird die Absorption der einzelnen Proben (Doppelbestimmung) bei 595 nm gegen BSA-Standards, die mit je 1 µl des Probenpuffers versetzt sind, gemessen und die Proteinkonzentration ermittelt. Der BIORAD-Proteinassay beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung des Farbstoffs „Coomassie Brilliant Blue G-250“ nach der Bindung von Proteinen von 465 auf 595 nm verschiebt.

### **3.10.3.4 Probenvorbereitung bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Eine bestimmte Menge der Proben wird mit der gleichen Menge an Probenpuffer versetzt und für 3 min auf 100 °C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis werden pro 10 µl Probe 0,5 µl DTT hinzugefügt. Der Proteinmarker wird ebenfalls 3 min auf 100 °C erhitzt.



## **Probenpuffer bei Polyacrylamidgelen**

Tris (pH 6,8)	0,125 M
SDS	4 %
Bromphenolblau	0,004 %
Urea	8 M
Glycerol	20 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 36 ml
β-Mercaptoethanol	10 %

### **3.10.3.5 Probenvorbereitung bei Tris-Tricine-Gelelektrophorese**

Eine bestimmte Menge der Probe wird hier mit der gleichen Menge an 2 x Tricine-Proben-Puffer versetzt und über 30 bis 60 min bei 40 °C inkubiert. 7,5 µl des „low-range“-Proteinmarkers werden mit der gleichen Menge an Probenpuffer versetzt.

#### **2 x Tricine-Proben-Puffer**

4 x TrisCl/SDS (pH 6,8)	2 ml
Glycerol	2,4 ml
SDS	0,8 g
DTT	0,2 M
Coomassie-Blue-G-250	2 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 ml

#### **4 x TrisCl/SDS (pH 6,8)**

Tris base	3,025 g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
SDS	0,2 g
pH-Wert mit HCl einstellen	

### 3.10.3.6 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine werden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Ein SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Zunächst wird das Trenngel zwischen 2 Glasplatten bis etwa 3 cm unter den oberen Rand gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Proteine gewählt. Nach ca. 1 h wird das Butanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Der Gelkamm mit der gewünschten Taschenbreite wird zwischen die Glasplatten eingeschoben und nach Polymerisation wird das Gel mit den Glasplatten vertikal in der Elektrophoresekammer befestigt. Nach Füllung der Gelkammer mit Elektrophoresepuffer wird der Gelkamm entfernt und die vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wird ein Proteingrößenmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 30 mA, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben und anschließend bei 40 mA für ca. 1 h. Nach Auftrennung der Proben können die Proteinbanden nun durch Anfärbung (Coomassie-Blau-Färbung) sichtbar gemacht werden oder durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot untersucht werden.

#### **Trenngel (12 %):**

4 x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8)	2,5 ml
Polyacrylamid (30%)	4,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 ml
Ammoniumpersulfat (40%)	15 µl
Temed	6 µl

#### **Sammelgel (4,5 %)**

4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris HCl, pH 6,8)	1,25 ml
Polyacrylamid (30 %)	750 µl

H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 5 ml
Ammoniumpersulfat (40%)	7,5 µl
Temed	3,0 µl

### **10 x Tris-Glycine-Puffer**

Tris	120 g
Glycine	576 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 4 l

### **Elektrophoresepuffer bei Polyacrylamidgelen**

10 x Tris-Glycine Puffer	50 ml
SDS (10%)	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

#### **3.10.3.7 Tris-Tricine-Gelelektrophorese**

Da die Auftrennung von Proteinen und Peptiden, die kleiner als 10 - 15 kD sind, in einem Polyacrylamidgel schwer möglich ist, verwenden wir hierfür Tris-Tricine-Gele, die wir von der Firma BIORAD fertig gegossen bezogen. Die Gele werden in der Elektrophoresekammer befestigt und die Gelkämme entfernt. Zwischen die beiden Gele wird der Kathodenpuffer gefüllt, in den unteren Teil der Elektrophoresekammer der Anodenpuffer. Die beiden Puffer sollten nicht gemischt werden. Nach Laden der Proben und des low-range-Proteinmarkers, erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei 20 V konstant für ungefähr eine Stunde, bis die Proben das Sammelgel passiert haben und anschließend bei 75 V konstant.

## Elektrophoresepuffer bei Tris-Tricine-Gelen

### 10 x Anodenpuffer (pH 8,9)

Tris	0,2 M
------	-------

### 1 x Kathodenpuffer (pH 8,25)

Tris	0,1 M
Tricine	0,1 M
SDS	1 %

#### 3.10.3.8 Western-Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden im Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt horizontal in einer Blot-Apparatur mit Graphitplatten. Zunächst werden die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in Gelgröße ausgeschnitten. Auf die untere Graphitplatte werden zunächst zwei in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere gelegt, darauf ein mit Anodenpuffer 2 befeuchtetes Filterpapier, und auf dieses wird die Nitrozellulosemembran platziert, die vorher in Methanol,  $H_2O_{dest.}$  und schließlich Anodenpuffer 2 eingeweicht war. Auf die Membran wird das Gel luftblasenfrei aufgelegt und mit 3 Lagen in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Nach Auflegen der Graphitplatte der Kathode erfolgt der Transfer der Proteine für 2 Stunden bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche. Anschließend werden die freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose durch Inkubation in PBS-T/ 10 % Magermilch bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht abgesättigt.

## **Blot-Lösungen**

### **Anodenpuffer 1 (pH 10,4)**

Tris	0,3 M
Methanol	20 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### **Anodenpuffer 2 (pH 10,4)**

Tris	25 mM
Methanol	20 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### **Kathodenpuffer (pH 10,5)**

Caps	70 mM
Methanol	20 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1 l

### **PBS (1 x)**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

## **PBS-T**

PBS (1x)	996 ml
TWEEN	4 ml

### **3.10.3.9 Immunodetektion**

Die Sättigungslösung wird verworfen, und nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBS-T erfolgt eine einstündige Inkubation der Membran in der Primärantiserumlösung (1:10000 verdünnt mit PBS-T) unter leichtem Schütteln bei RT. Nach Entfernung der Primärantiserumlösung (diese kann noch einmal verwendet werden) wird zweimal 15 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine vierzigminütige Inkubation mit einem Sekundärantiserum. Anschließend wird erneut dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und der Blot entwickelt. Als Substrat verwendet man pro Membran 1,5 ml der ECL-Entwicklungslösung (1:1 Mischung von ECL 1 und ECL 2) und exponiert die Membran für 1 min. Anschließend wird die Membran in Klarsichtfolie gewickelt, ein Chemolumineszenz-Film belichtet und der Film in einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

### **3.10.3.10 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen**

Nach der SDS-Page werden die Glasplatten entfernt und das Gel vorsichtig in eine Coomassie-Färbelösung transferiert. Die Inkubation erfolgt unter leichtem Schütteln für 20 min. Anschließend wird das Gel so lange in einer Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen ist und die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Nun kann das Gel fotografiert oder auf einer Vakuumpumpe getrocknet werden.

### **Coomassie-Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,25 g
Methanol	45 ml

H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	45 ml
Essigsäure (100 %)	10 ml

### **Entfärbelösung**

Methanol	30 %
Essigsäure (100 %)	10 %

### **3.11 Fluoreszenzimmunzytochemie**

Zur weiteren Charakterisierung des Proteins P8 wurde eine Fluoreszenzimmunzytochemie an stabilen INS-1-Zellen durchgeführt. Hierdurch ist es möglich, die Lokalisation des Proteins unter Verwendung eines für das Protein spezifischen Antiserums und eines zweiten fluoreszenzmarkierten Antiserums sichtbar zu machen. Nachdem die Zellen auf Objektträger gesplittet worden waren, wurden sie bei 50 %iger Konfluenz alle 12 Stunden mit 5 mM IPTG stimuliert, und nach 72 h erfolgte die immunzytochemische Färbung. Hierzu werden die Zellen 5 min mit 4 % igem Paraformaldehyd auf den Objektträgern fixiert und anschließend dreimal 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Nach 5 minütiger Inkubation in Methanol (-20 °C) werden die Zellen erneut einmal in 1 x PBS gewaschen, in einer Feuchtkammer platziert und zum Immobilisieren und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen mit 500 µl 3 %igem „normal donkey serum“ (NDS) überschichtet. Nach 30 min wird das NDS abgekippt und die Objektträger mit 500 µl des 1. Antiserums (1:500 in PBS verdünnt) überschichtet. Nach Inkubation von 1 - 2 h werden die Objektträger dreimal in 1 x PBS gewaschen und erneut für 30 min mit 3 % NDS überschichtet. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen mit dem 2. Antiserum in einer abgedunkelten Feuchtkammer für 30 - 60 min. Hierfür wurde das fluoreszenzmarkierte Antiserum DA-Cy-3 (*Jackson Immuno-Research*) in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wird die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt, ein Tropfen ImmuMount (*Shandon*) auf die Objektträger gegeben und diese mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Nun erfolgten die Mikroskopie am Fluoreszenzmikroskop und die Fotografie mittels Digitalkamera.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines polyklonalen Kaninchen-P8-Antiserums

#### 4.1.1 Klonierung des Expressionsvektors für GST-P8

Um die Expression des Proteins P8 in Bakterien zu ermöglichen, wurde die P8-cDNA in einen GST-Vektor (pGEXKG) kloniert, der von Dr. J. Seufert zur Verfügung gestellt wurde. Die Besonderheit dieses Vektors besteht darin, dass Proteine als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST), 26 kDa, exprimiert werden. Das GST-Gen enthält sowohl eine ATG-Site als auch eine Ribosomen-Bindungsstelle und unterliegt der Kontrolle des tac-Promotors, so dass eine gezielte Expression des GST-Fusionsproteins durch IPTG-Stimulation erfolgen kann. Zur Expression wurden die proteasedefizienten *E. coli BL21* verwendet, die eine hohe Expressionseffizienz rekombinanter Proteine ermöglichen. Durch einen dreistündigen Verdau des Vektors rp8pCRIItopo+ mit Eco RI beziehungsweise pGEXKG mit Xba I wurde zum einen die Sequenz der rP8-cDNA ausgeschnitten und zum anderen der Empfängervektor linearisiert. Sowohl bei dem cDNA-Fragment als auch bei dem linearisierten pGEXKG-Vektor entstanden überhängende Enden, die nicht miteinander kompatibel waren. Um eine Ligation zu ermöglichen, wurden die Enden beider Fragmente mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt, sogenanntes „blunten“. Zur Verhinderung einer Religation des Vektors ohne Insert wurde dieser dephosphoryliert. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Schnittstellen der jeweiligen Enzyme im Vektor dargestellt.

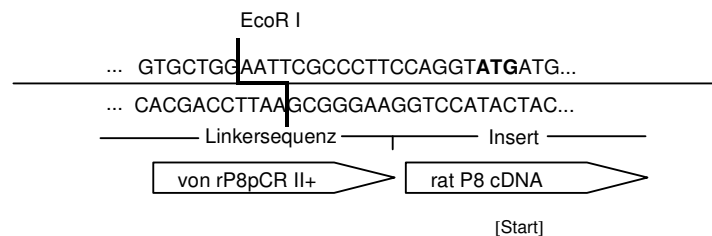
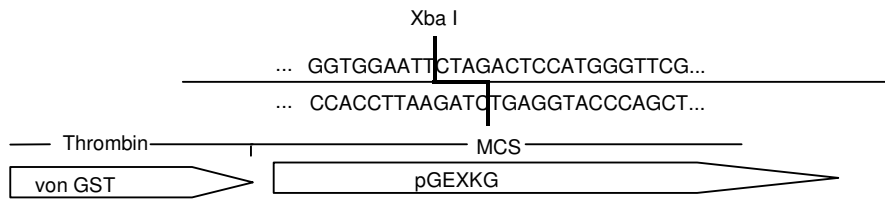


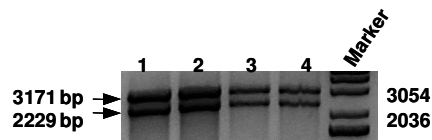
Abb. 3: Ausschnitt der Sequenz von rp8pCR II topo + mit Schnittstelle des Enzyms Eco RI





**Abb. 4:** Ausschnitt der Sequenz des Vektors pGEXKG mit Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Xba I, die innerhalb der „multiple cloning site“ (MCS) des Vektors liegt.

Nach Auftrennung des cDNA-Fragments und des linearisierten Vektors in einem 1,2 % Gel, wurden die DNA-Fragmente für P8 und pGEXKG extrahiert und bei RT über Nacht mit T4-Ligase ligiert. Nach Transformation in hitzekompetente *E. coli JM 109*, Selektionierung und Vermehrung erfolgte die Kontrolle der positiven Klone durch Sequenzierung. Um eine Expression des GST-Fusionsproteins zu ermöglichen, wurde der Vektor rP8pGEXKG in *BL21* durch Elektroporation transformiert, erneut selektioniert, vermehrt und mittels Verdau durch Eco RV und Xho I kontrolliert. Da die Größe des Vektors rP8pGEXKG 5400 bp beträgt und die Schnittstellen der beiden Enzyme bei 4155 bp (Eco RV) und bei 984 bp (Xho I) liegen, wurden nach Auftrennung im Agarosegel Banden bei 3171 bp und bei 2229 bp erwartet. Dieses ist auch in der nachfolgenden Abbildung erkennbar.



**Abb. 5:** Kontrollverdau des Vektors rP8pGEXKG mit Eco RV und Xho I

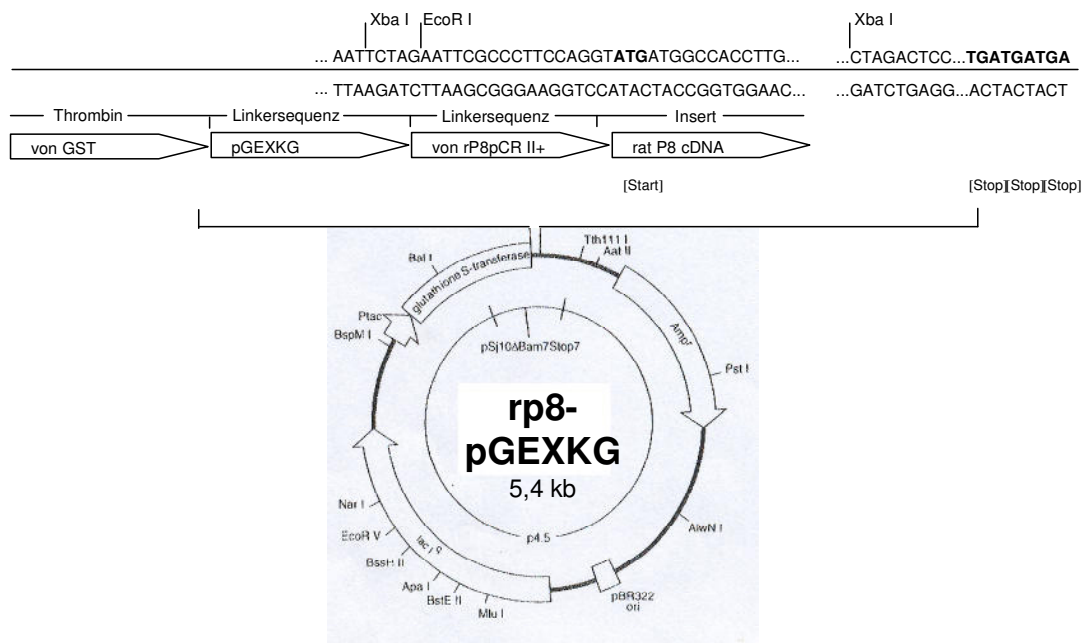
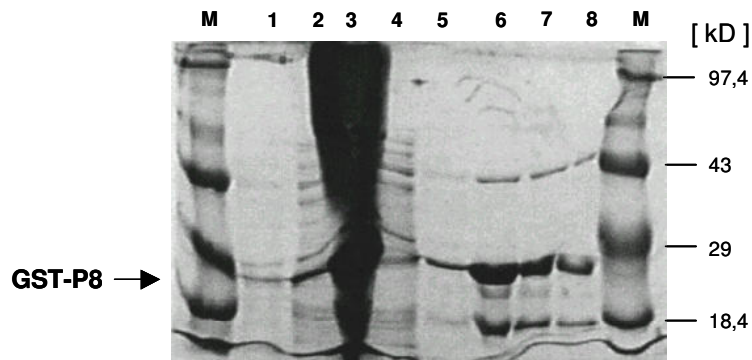


Abb. 6: Darstellung des klonierten Vektors für das P8-GST-Fusionsprotein rp8pGEXKG

#### 4.1.2 Expression des P8-GST-Fusionsproteins

Im Anschluss erfolgten eine erneute Vermehrung der Bakterien und die Stimulation mittels IPTG, um die Expression des GST-P8-Fusionsproteins zu erreichen. Die in den Bakterien enthaltenen Proteine wurden durch Beaten gewonnen, und über eine Glutathion-Sepharose-Säule erfolgte die Reinigung und Elution des GST-P8-Proteins. Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgender Coomassie-Blau-Färbung erkennt man deutlich eine Bande bei ca. 28 kD bei den stimulierten Bakterien, die auch nach Elution des GST-P8-Proteins sichtbar ist. Bei der weiteren sichtbaren Bande handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung.



**Abb. 7: Coomassie-Blau-Färbung eines Polyacrylamidgels**

1. BL21 vor Stimulation; 2. BL21 nach Stimulation; 3. Proteinextrakt gesamt; 4. Eluat nach dem ersten Waschschrift; 5. Eluat nach dem zweiten Waschschrift; 6.-8. Eluat von GST-P8

Das gewonnene GST-P8-Protein wurde zur Produktion des polyklonalen Kaninchen-P8-Antiserums verwendet. Aufgrund der geringen Größe des Proteins P8 konnte dies nicht in reiner Form zur Beimpfung der Kaninchen verwendet werden.

#### 4.1.3 Charakterisierung des Antiserums

Das P8-Antiserum wurde mittels Western-Blot charakterisiert. Hierfür wurden COS-7-Zellen mit dem „green fluorescence protein“ (EGFP) und einem Expressionsvektor für das P8-EGFP-Fusionsprotein, das von Martin Gehlen zur Verfügung gestellt wurde, transfiziert. Die Ganzzellextrakte dieser transfizierten Zellen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Bei Verwendung von  $\alpha$ -GFP als erstem Antiserum erkennt man bei den mit EGFP transfizierten Zellen eine Bande bei 31 kD und bei den mit P8-EGFP transfizierten Zellen eine Bande bei 40 kD. Diese Bande dient als Marker für P8-EGFP. Bei Gebrauch des P8-Präimmunserums sieht man wie erwartet keine spezifische Markierung. Nach Inkubation der Membran mit dem ersten  $\alpha$ -P8-Immunsersum erkennt man eine Bande, die auf gleicher Höhe liegt wie die Markerbande für P8-EGFP, und unter Verwendung des zweiten P8-Immunsersum wird eine stärkere Anfärbung dieser Bande erkennbar.

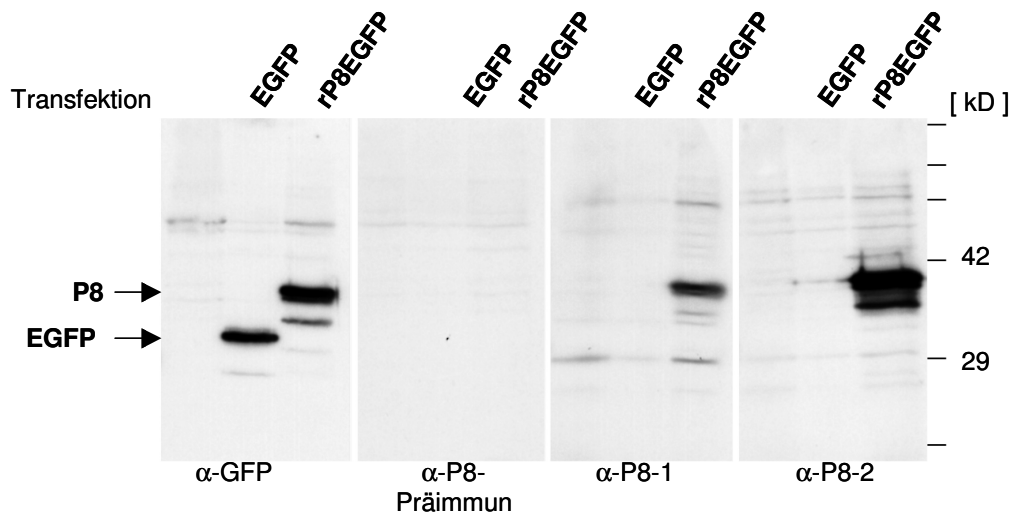


Abb. 8: Western-Blot mit  $\alpha$ -GFP,  $\alpha$ -P8-Präimmunserum,  $\alpha$ -P8-1-Immunsersum und  $\alpha$ -P8-2-Immunsersum unter Verwendung von Ganzzellextrakten von COS-7-Zellen, die mit EGFP und rp8EGFP transfiziert wurden.

Um nun die Expression von nativem P8 ebenfalls darstellen zu können, wurden COS-7-Zellen mit dem P8-Expressionsvektor rp8pcDNA3.1+ und zur Kontrolle mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Die Auftrennung der Ganzzellextrakte erfolgte in einem Tris-Tricine-Gel. Nach Inkubation der Membran mit  $\alpha$ -P8-Immunsersum-2 sieht man in den Zellen, die mit dem P8-Expressionsvektor transfiziert wurden, eine Bande bei 14 kD, die bei den Kontrollzellen, welche mit dem Leervektor pcDNA3.1+ transfiziert wurden, nicht erscheint. Das Präimmunserum für P8 zeigt keine spezifischen Banden.

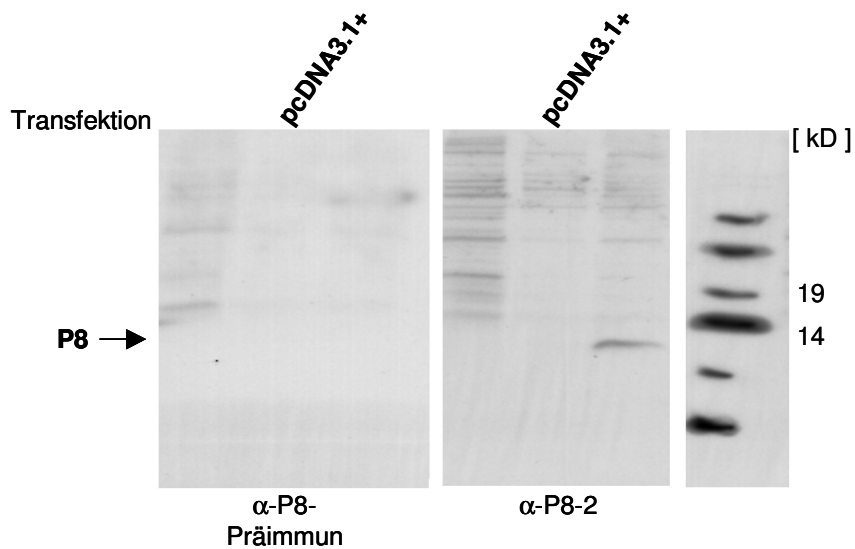


Abb. 9: Western-Blot mit  $\alpha$ -P8-Präimmunserum und  $\alpha$ -P8-2-Immunserum unter Verwendung von Ganzzelextrakten von COS-7-Zellen, die mit pcDNA 3.1+ und rp8pcDNA 3.1+ transfiziert wurden.

In einem weiteren Versuchsansatz zur Darstellung der nativen P8-Expression wurden COS-7-Zellen mit dem P8-Expressionsvektor rp8pcDNA I beziehungsweise mit dem Kontrollvektor pcDNA I transfiziert. Bei dem Western-Blot wurden sowohl Ganzzelextrakte als auch nukleäre Extrakte in einem Tris-Tricine-Gel aufgetrennt und mit  $\alpha$ -P8-Immunserum-2 inkubiert. Auch hier sieht man sowohl bei den Ganzzelextrakten wie auch bei den nukleären Extrakten bei den mit P8 transfizierten Zellen eine spezifische Bande auf der Höhe von 14 kD. Hieraus lässt sich schließen, dass das  $\alpha$ -P8-Immunserum-2 ein positives Anti-P8-Antiserum ist, eine höhere Affinität zu P8 besitzt als das erste Immunserum und somit für weitere Charakterisierungen verwendet werden kann.

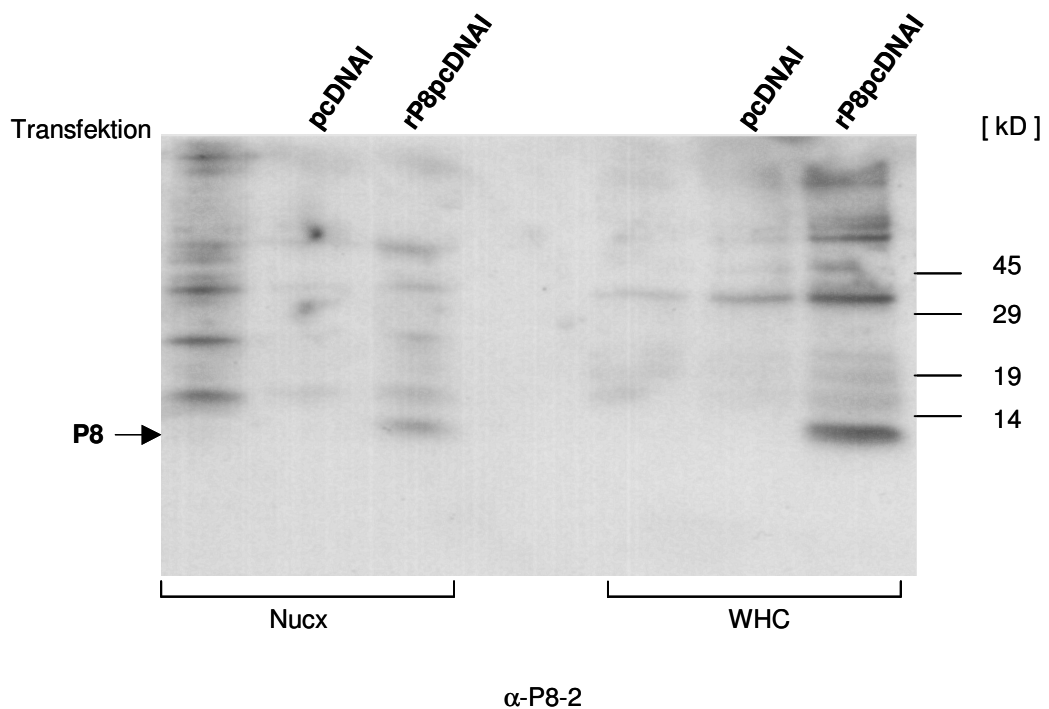
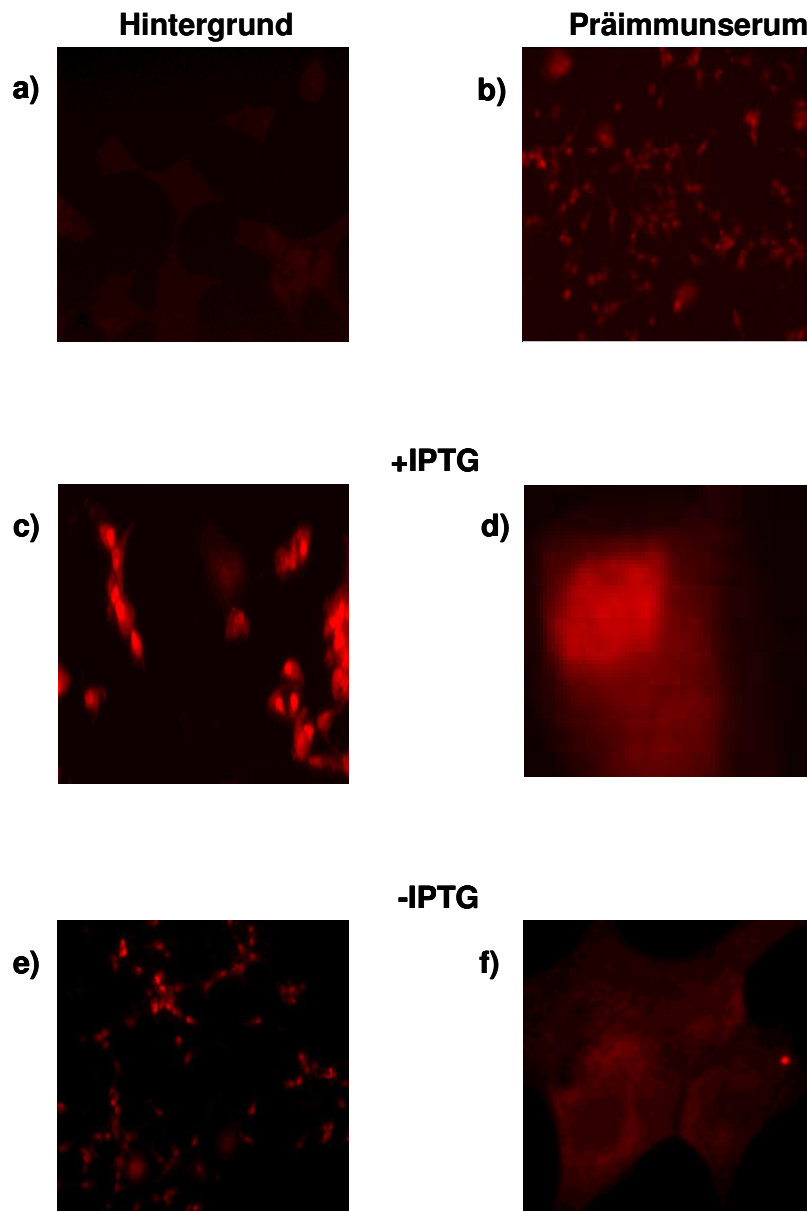


Abb. 10: Western-Blot mit  $\alpha$ -P8-2 Immunsereum unter Verwendung von Ganzzelextrakten ( WHC) und nukleären Extrakten (Nucx) von COS-7-Zellen, die mit pcDNA I und rp8pcDNA I transfiziert wurden.

## 4.2 Zelluläre Lokalisation von P8

Die zelluläre Lokalisation des Proteins P8 erfolgte mittels Fluoreszenzimmunzytochemie unter Verwendung des spezifischen P8-Antiserums. Stabile INS-1-Zellen wurden für 72 h mit 5 mM IPTG stimuliert, um eine Überexpression von P8 zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zum Vergleich wurden zum einen Kontrollzellen mitgeführt, welche nicht mittels IPTG induziert wurden, zum anderen stimulierte Zellen mit Präimmunsereum inkubiert. Bei den mit dem Präimmunsereum inkubierten Zellen (11 b) ist eine leichte Hintergrundfärbung zu erkennen, welche zu berücksichtigen ist. Die Zellen, die durch IPTG-Induktion P8 überexprimieren, zeigen eine deutliche Anfärbung der Zellkerne (11 c+d). Bei Betrachtung der Kontrollzellen im Vergleich zu den stimulierten Zellen fällt eine deutlich geringere Anfärbung der Zellen und vor allem der Zellkerne auf (11 e+f). Einige der Kontrollzellen zeigen ebenfalls eine Kernfärbung, was daran liegt,

dass die normale P8-Expression dieser Zellen nicht unterdrückt werden kann, diese aber sehr gering ist. Wichtig ist insofern der Vergleich zwischen den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen.



**Abb. 11: Fluoreszenzimmunzytochemie von stabilen INS-1-Zellen mit /ohne Stimulation durch IPTG:**  
a) Hintergrund, b) Anfärbung mit dem Präimmunserum, c+d) mit IPTG stimulierte INS-1-Zellen, e+f) nicht-stimulierte Kontrollzellen

### 4.3 Nachweis von P8 in endokrinen Betazellen und duktafen Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas

Um den Nachweis zu erbringen, dass P8 sowohl in insulinproduzierenden Betazellen als auch in duktafen Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas exprimiert wird, wurde aus INS-1-Zellen und aus AR42-J-Zellen RNA isoliert. Hierfür wurde je eine konfluente 10 cm Zellkulturschale verwendet und die Menge an gewonnener RNA nach DNase-1-Verdau photometrisch bestimmt. Pro Ansatz wurden ca. 3 µg RNA nach Transkriptionsstart mit Oligo dt in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation erfolgte mit 3 µl cDNA und spezifischen Primern für Ratten-P8. Nach 24 Zyklen sind deutlich Banden bei 300 Basenpaaren zu erkennen. (Zyklusbedingungen: Denaturierung: 94 °C, 30 s; Extension 58 °C, 30 s; Polymerisation 72 °C, 45 s; abschließende Polymerisation bei 72 °C für 30 s). Für den Nachweis von P8 in humanen Pankreasinseln wurde cDNA verwendet, die freundlicherweise von Dr. J. Seufert bereitgestellt wurde. Die Amplifikation erfolgte hierbei unter Verwendung des *Advantage HF™-PCR-Kits* und spezifischen Primern für humanes P8. Zusätzlich wurden dem PCR-Ansatz 2 % DMSO zugefügt. Auch hier erkennt man nach 32 Zyklen eine Bande für P8 bei 300 Basenpaaren. (Zyklusbedingungen: Denaturierung: 94 °C, 15 s; Extension: 94 °C, 10 s; Polymerisation: 68 °C, 4 min; abschließende Polymerisation bei 68 °C für 3 min).

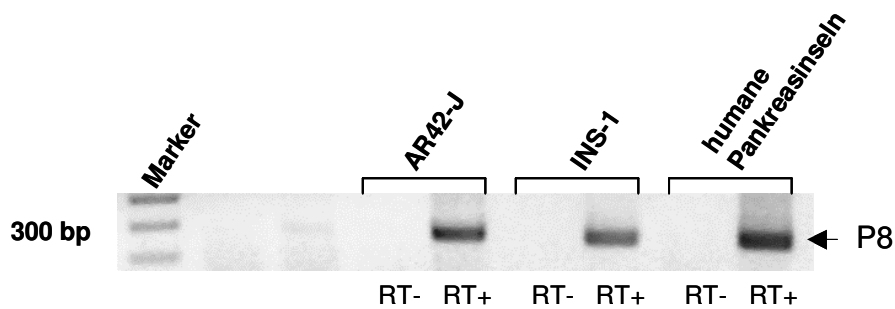


Abb. 12: Nachweis der p8-mRNA-Expression in AR42-J-, INS-1-Zellen und humanen Pankreasinseln; RT-PCR



#### **4.4 Regulation der Expression von P8 auf mRNA-Ebene**

Um das Protein P8 näher zu charakterisieren, wurde die Regulation der P8-Expression untersucht. Hierbei waren vor allem Faktoren von Interesse, von welchen bekannt ist, dass sie eine proliferationsinduzierende Wirkung bei Betazellen des endokrinen Pankreas besitzen. Im Speziellen wurden die Wirkungen von Glukose und Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1) sowohl in der endokrinen Beta-Zelllinie INS-1 als auch in der duktaalen Vorläuferzelllinie AR42-J dargestellt.

##### **4.4.1 Regulation der Expression von P8 durch Glukose**

Um die Regulation der P8-Expression durch Glukose darzustellen, wurden als Ausgangswert beide Zelllinien mit Medium vorinkubiert, welches eine Glukosekonzentration von 11,1 mM hatte. Nachdem die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen derart gesplittet wurden, dass eine 50 % ige Konfluenz vorlag, wurden die Zellen über 3, 6, 12, 24, und 48 h mit Medium mit 25 mM Glukose bzw. 5,6 mM Glukose inkubiert und anschließend die RNA extrahiert. Kontrollzellen wurden mit 11,1 mM Glukose über die gleichen Zeiträume inkubiert. Nach Verdau der RNA mittels DNase-1 wurden die Proben photometrisch bestimmt und je 3 µg in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine Amplifikation von P8 mit 24 Zyklen unter Verwendung der spezifischen Ratten-P8-Primer, wofür 3 µl cDNA pro Ansatz eingesetzt wurden. Gleichzeitig wurde das „house keeping gene“ Beta-Aktin amplifiziert, um einen Vergleich der Bandenintensität und somit der Expression zu ermöglichen. Bei Inkubation der INS-1-Zellen mit 25 mM Glukose erkennt man einen deutlichen Anstieg der Expression von P8 über 48 h. Bei Inkubation mit 5,6 mM Glukose wird eine Tendenz der Expressionsreduktion von P8 auf mRNA-Ebene deutlich. In AR42-J-Zellen findet man weder bei Inkubation mit 25 mM Glukose, noch bei Inkubation mit 5,6 mM Glukose eine Änderung der Expression von P8. Die P8-Expression bei den Kontrollzellen verhielt sich konstant.

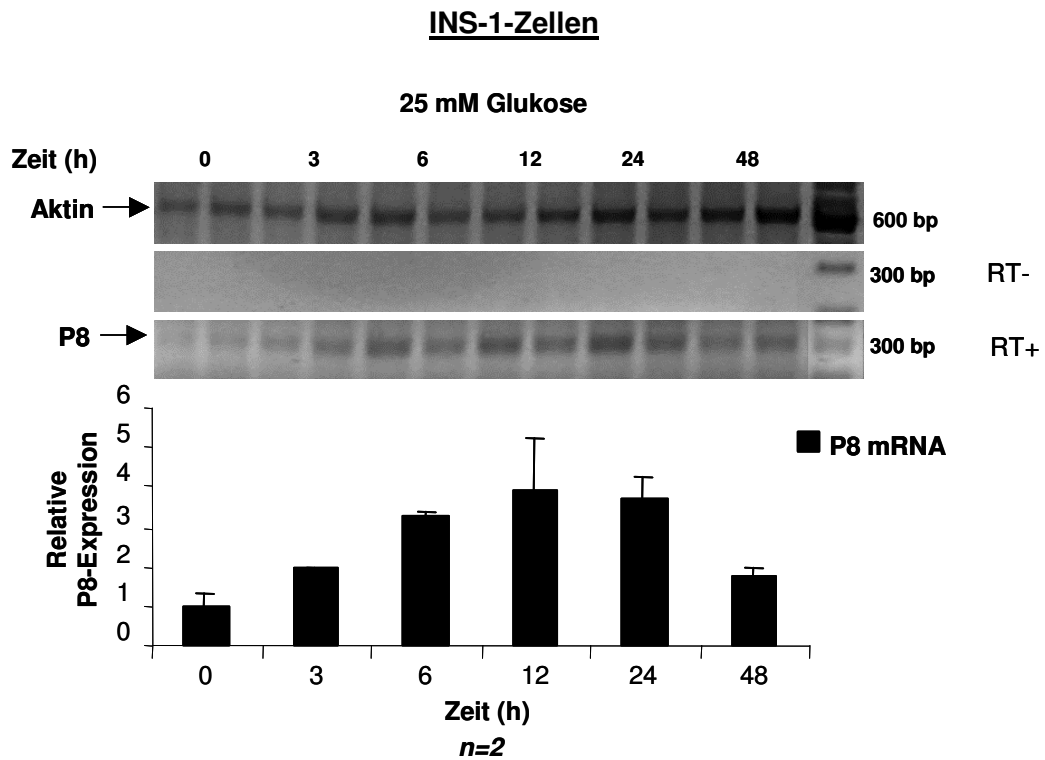


Abb. 13: Zeitabhängige p8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen unter Stimulation mit 25 mM Glukose (0, 3, 6, 12, 24, 48 h); semiquantitative RT-PCR

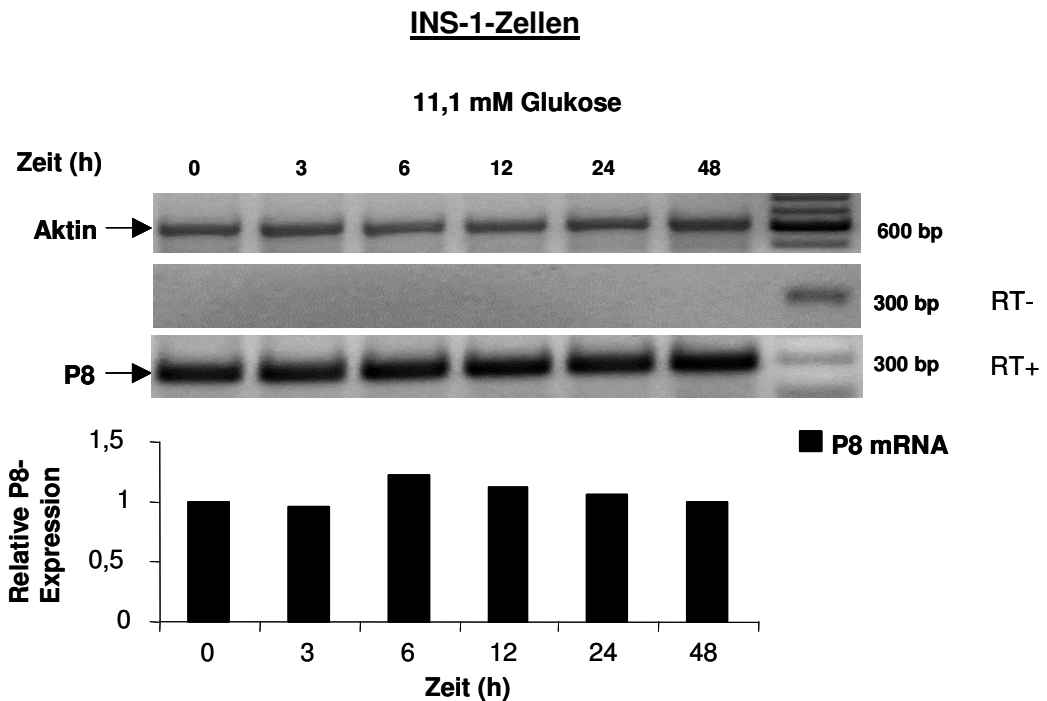


Abb. 14: Zeitabhängige p8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen unter Stimulation mit 11,1 mM Glukose (0, 3, 6, 12, 24, 48 h); semiquantitative RT-PCR

## INS-1-Zellen

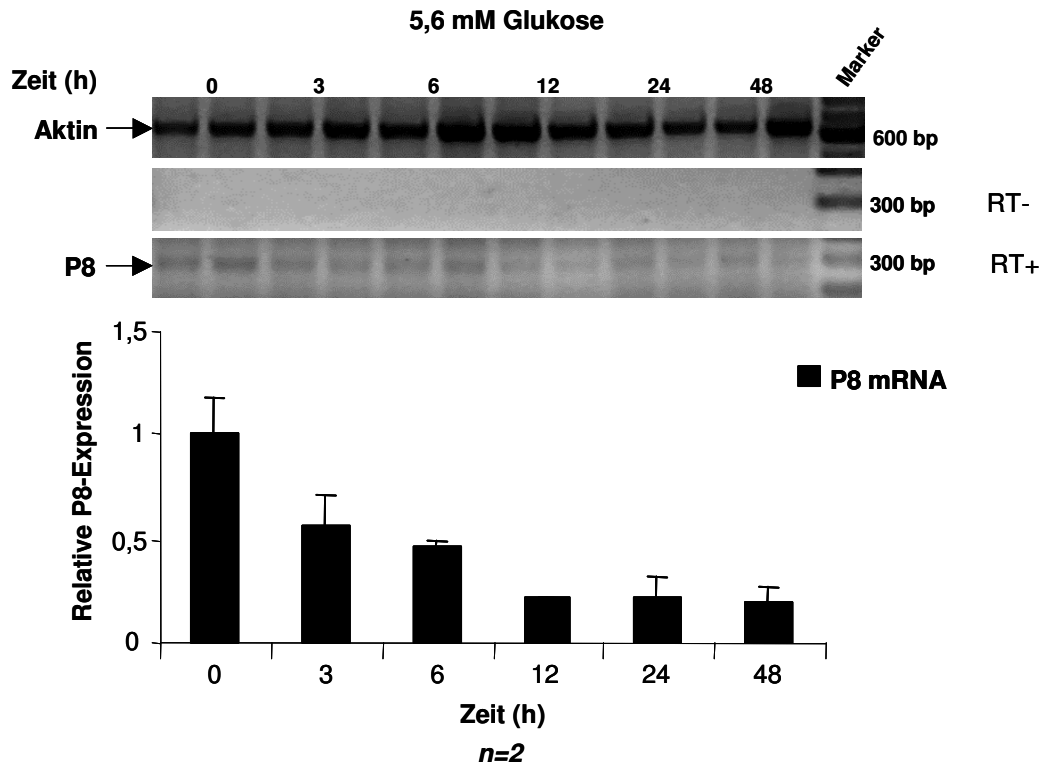


Abb. 15: Zeitabhängige p8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen unter Stimulation mit 5,6 mM Glukose (0, 3, 6, 12, 24, 48 h); semiquantitative RT-PCR

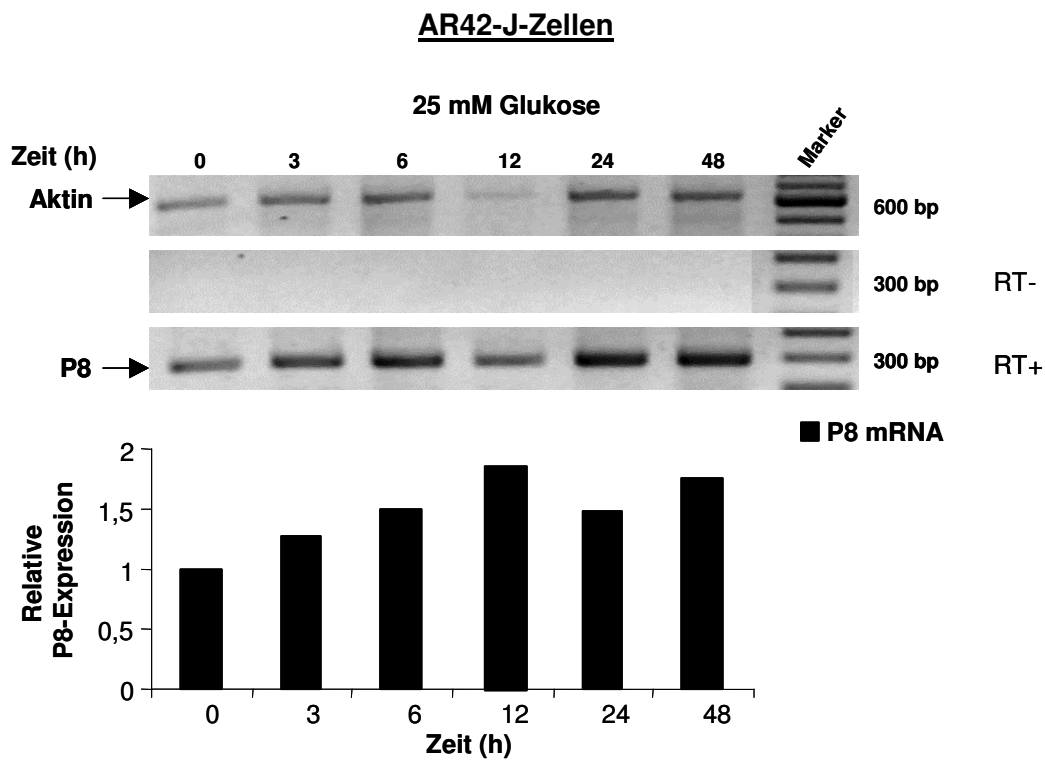


Abb. 16: Zeitabhängige p8-mRNA-Expression in AR42-J-Zellen unter Stimulation mit 25 mM Glukose (0, 3, 6, 12, 24, 48 h); semiquantitative RT-PCR

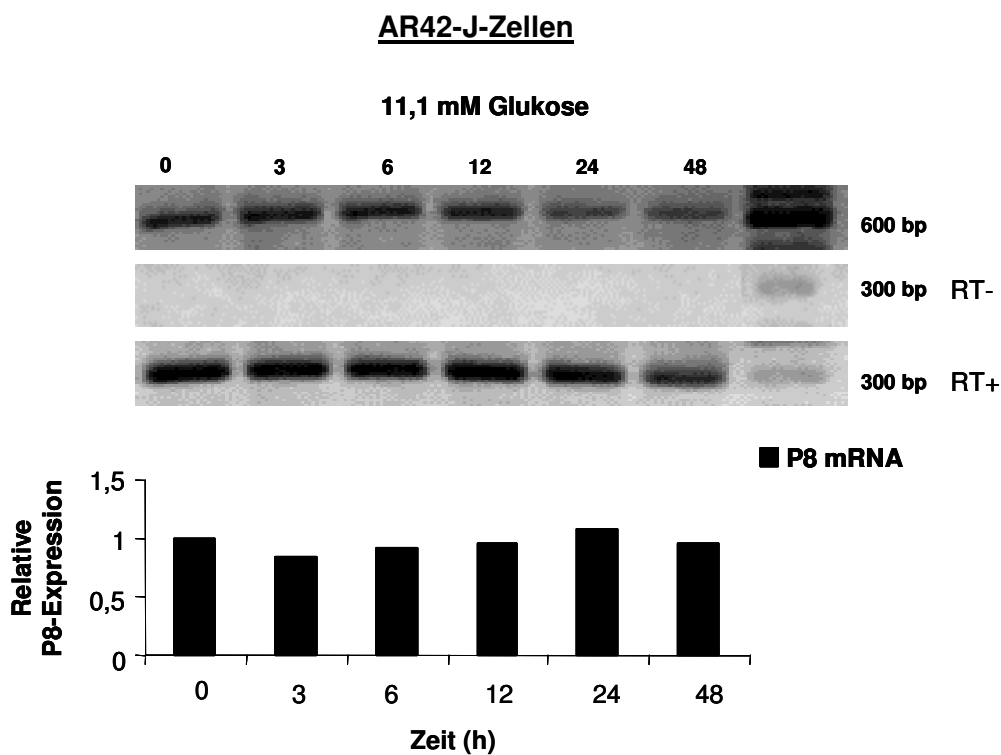


Abb. 17: Zeitabhängige p8-mRNA-Expression in AR42-J-Zellen bei 11,1 mM Glukose (0, 3, 6, 12, 24, 48 h); semiquantitative RT-PCR



#### **4.4.2 Regulation der Expression von P8 durch Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1)**

Um die Regulation der P8-Expression durch das Peptidhormon GLP-1 zu untersuchen, wurde uns von der Firma BioNebraska freundlicherweise GLP-1 (7-36) amide zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden ausgehend von Standardzellkulturmedium mit 11,1 mM Glukose auf 50 % Konfluenz gesplittet. Da das Peptidhormon keine hohe Stabilität aufweist, wurde das Zellkulturmedium mit 1 % Proteaseinhibitor Trasylol supplementiert und die Stimulation mit 100 nM GLP-1 (verdünnt mit 1 x PBS) alle 12 h wiederholt. Nach 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA der stimulierten wie der Kontrollzellen extrahiert, mittels DNase-1 verdaut, um einer Verunreinigung der RNA mit DNA vorzubeugen, und je 3 µg der RNA nach Transkriptionsstart mit Oligo dT in cDNA umgeschrieben. Nach 24 Amplifikationszyklen mit P8-spezifischen Primern und Primern für das „house keeping gene“ Beta-Aktin erkennt man bei beiden, sowohl bei INS-1-Zellen als auch bei AR42-J-Zellen, eine Änderung der P8-Expression auf mRNA-Ebene. In INS-1-Zellen steigt die Expression von P8 konstant über 72 Stunden an, wobei bei den unstimulierten Kontrollzellen kein derartiger Anstieg zu verzeichnen ist. Bei den AR42-J-Zellen ist ebenfalls ein Expressionsanstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennbar, welcher jedoch nach 72 Stunden rückläufige Tendenz zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in INS-1-Zellen ein Anstieg der P8-Expression nach Stimulation mit proliferationsassoziierten Faktoren wie Glukose und Glukagon-like Peptide 1 erkennen lässt. Bei AR42-J-Zellen zeigt nur Glukagon-like Peptide 1 einen expressionssteigernden Effekt über 72 Stunden, nicht aber Glukose.

### INS-1-Zellen

GLP-1 (100nM)

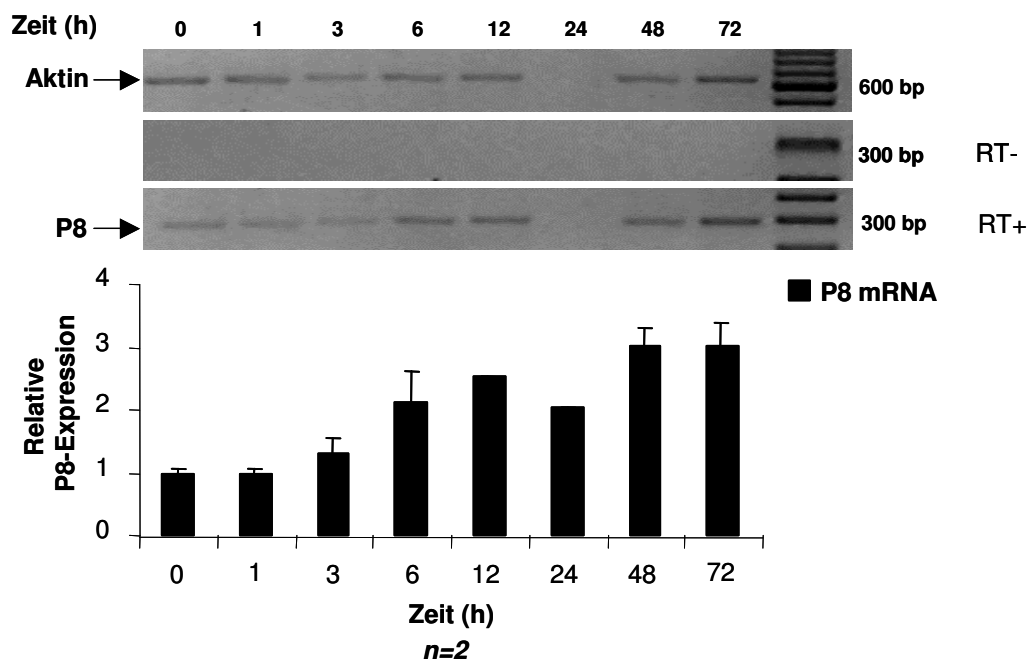


Abb. 19: Zeitabhängige relative P8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen unter GLP-1-Stimulation (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

### INS-1-Zellen

Vehikel

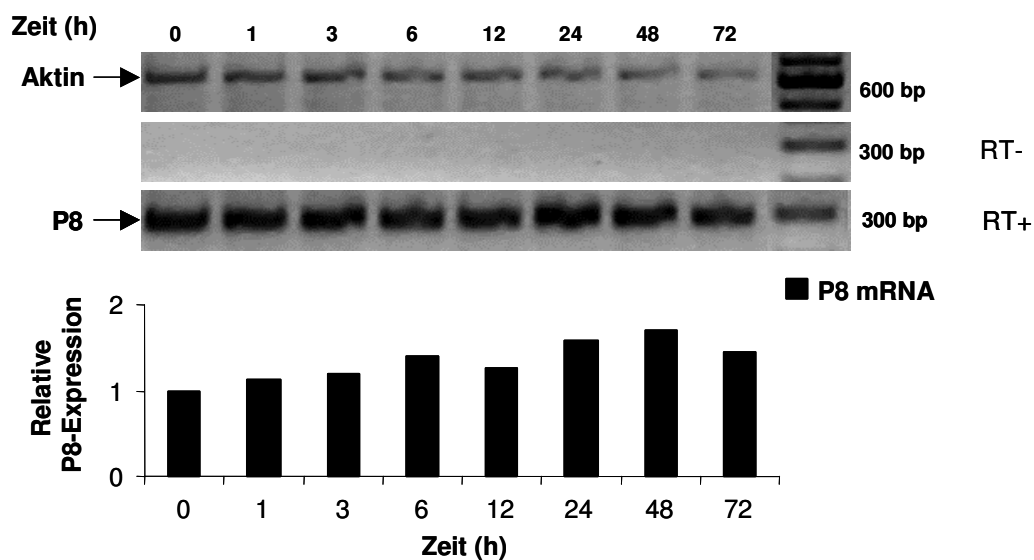


Abb. 20: Zeitabhängige relative P8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

**AR42-J-Zellen**

GLP-1 (100nM)

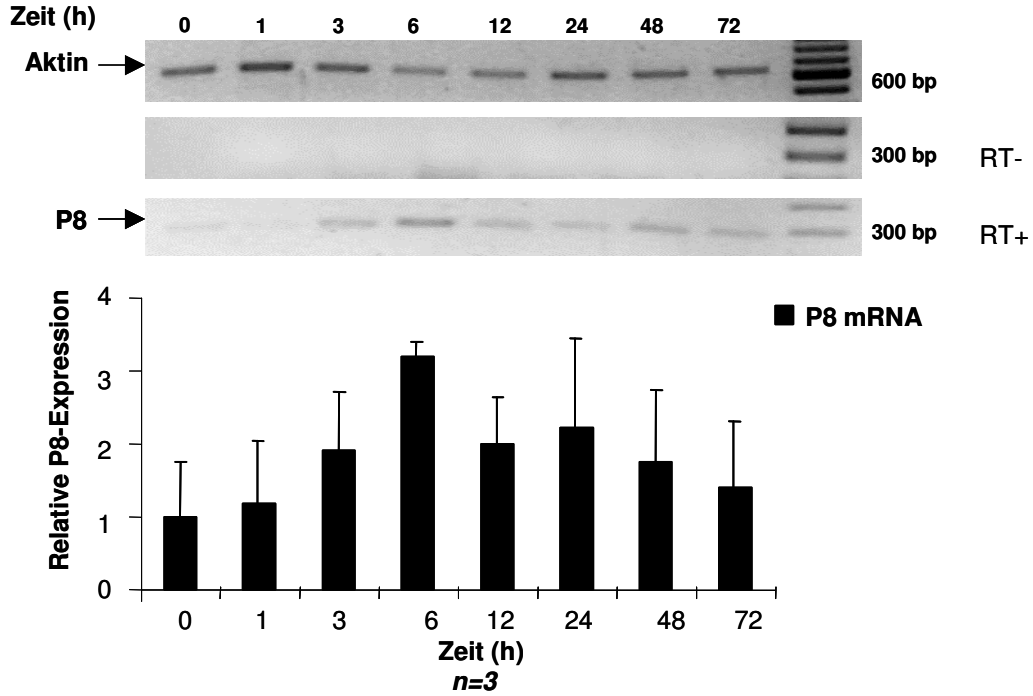


Abb. 21: Zeitabhängige relative P8-mRNA-Expression in AR42-J-Zellen (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

**AR42-J-Zellen**

Vehikel

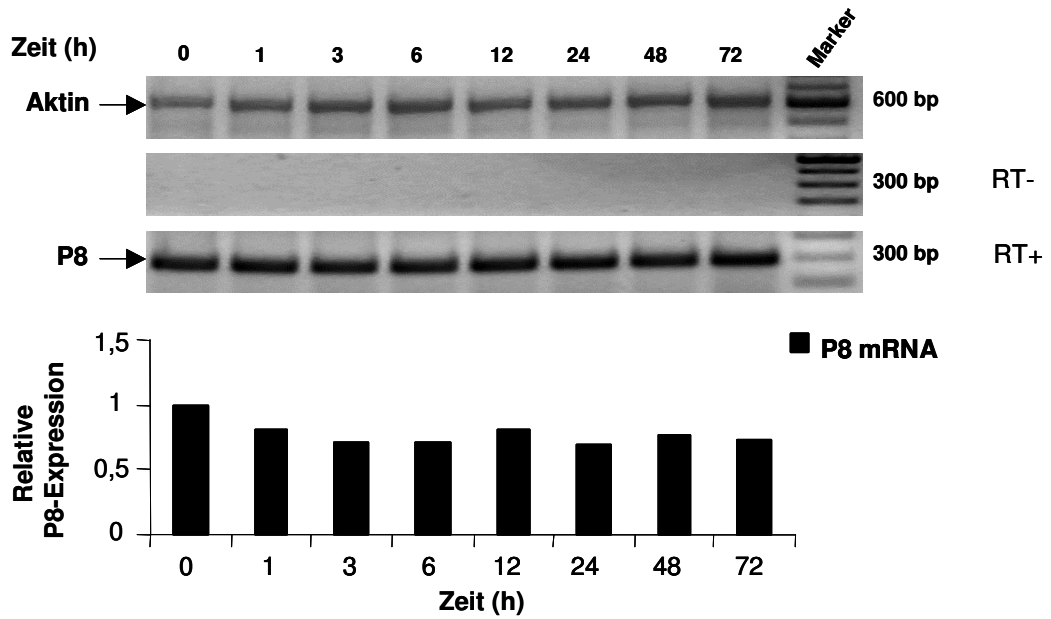


Abb. 22: Zeitabhängige relative P8-mRNA-Expression in AR42-J-Zellen (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR



## 4.5 Subklonierung verschiedener Vektoren

### 4.5.1 Klonierung von rp8pcDNA 3.1+

Um die Expression von P8 in eukaryoten Zellen zu ermöglichen, wurde ein geeigneter Expressionsvektor für P8 kloniert. Hierfür wurde P8 mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Xho I in einem 3 stündigen Verdau aus dem Vektor rp8pcR II topo+, der freundlicherweise von Dr. J. Seufert zur Verfügung gestellt wurde, herausgeschnitten. Mit den gleichen Restriktionsendonukleasen wurde auch der Empfängervektor pcDNA3.1+ linearisiert. Die Schnittstellen beider Enzyme liegen bei diesem Vektor in der „multiple cloning site“ (MCS). Nach Auftrennung in einem 1,2 % igen Agarosegel wurden sowohl die cDNA von P8 also auch die cDNA von pcDNA 3.1+ aus dem Gel extrahiert und mittels T4-Ligase bei 14 °C über 36 h ligiert.

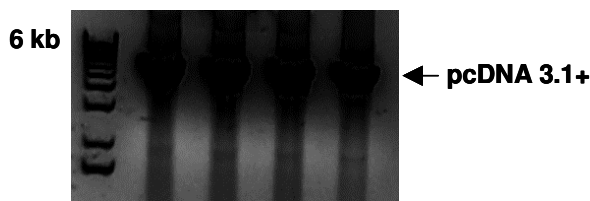


Abb. 23: Verdau von pcDNA 3.1+ mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Xho I

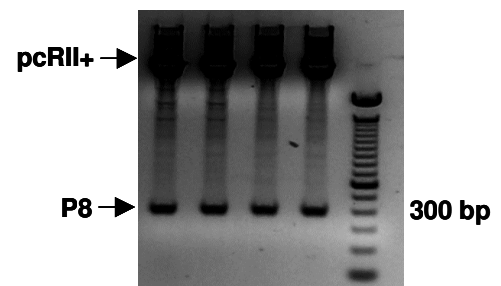


Abb. 24: Verdau von rp8pcR II+ mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Xho I

Nach anschließender Transformation in kompetente *E. coli* - *XL1-blue* mittels Elektroporation, Selektionierung und Vermehrung konnte bei der Plasmidpräparation eine suffiziente Menge an Plasmid-DNA gewonnen werden. Zur Kontrolle wurde der Vektor für 30 min mit den oben genannten Restriktionsendonukleasen verdaut und auf einem 1,2 % Agarosegel analysiert. Man erkennt bei den Ansätzen eine Bande auf der Höhe von ca. 300 Basenpaaren, die der P8-Bande entspricht.



Abb. 25: Kontrollverdau nach Ligation von rp8pcDNA 3.1+ mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und Xho I

Zur weiteren Kontrolle wurde das Plasmid ansequenziert und mit der bekannten Sequenz für P8 verglichen.

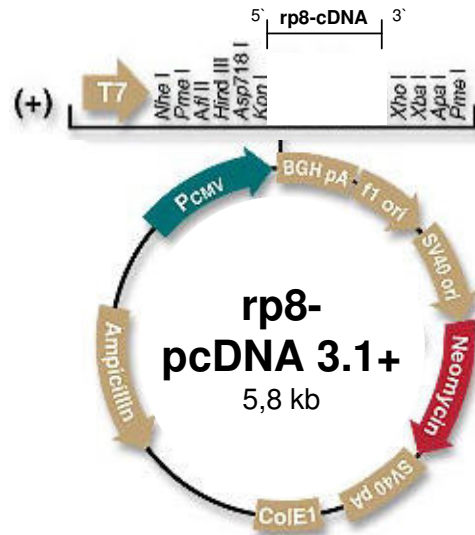


Abb. 26: Darstellung des klonierten Vektors rp8pcDNA 3.1+. Die Größe beträgt 5,8 Kilobasen. Die rp8cDNA wurde als ein Xho I / Kpn I-Fragment in voller Länge hineinkloniert.

#### 4.5.2 Klonierung von rp8pcDNA I

Als weiteren Expressionsvektor für rP8 wurde die cDNA für rP8 in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA I kloniert. Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli* MC1061/P3 verwendet, die eine hohe Transformationseffizienz von Vektoren ermöglichen, welche das Episom P3 zu Selektionierung und Überleben benötigen. Das P3 Episom ist ca. 60 kb groß und kodiert für das Wildtyp Kanamycin-Gen wie auch für mutierte Ampicillin und Tetrazyklin Resistenzgene. Das heißt, dass *E. coli*, die nur das P3 Episom tragen, resistent gegen Kanamycin aber sensitiv auf Ampicillin und Tetrazyklin sind. Werden diese aber mit Vektoren transformiert, welche den sup F Suppressor tragen, werden die Mutationen unterdrückt, und sie werden sowohl gegen Ampicillin als auch gegen Tetrazyklin resistent, so dass eine Selektionierung erfolgen kann. Die rP8 cDNA wurde aus dem Vektor rp8pcRII TOPO+ unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen Xho I und Hind III in einem zweistündigen Verdau ausgeschnitten und der Vektor pcDNA I bei gleichen Bedingungen linearisiert. Nach

Auftrennung in einem 1,2 % Agarosegel, Gelextraktion und Ligation über Nacht bei 14 °C erfolgte die Transformation in hitzekompetente *MC1061/P3*.

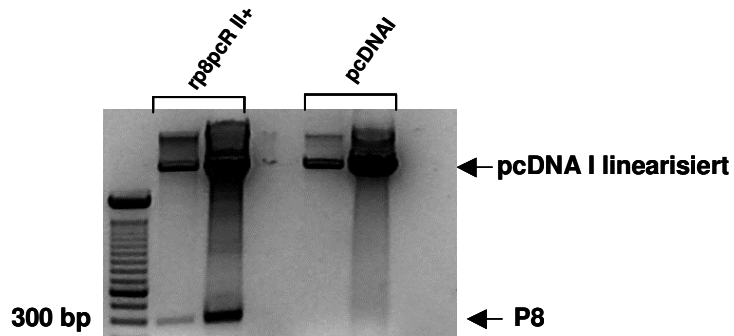


Abb. 27: Verdau von rp8pcR II+ und pcDNA I mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I

Nach Selektion und Plasmidpräparation konnte mittels Verdau durch Xho I und Hind III über 1,5 h gezeigt werden, dass der klonierte Vektor positiv für P8 ist.

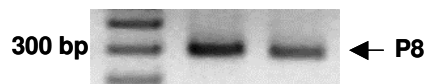


Abb. 28: Kontrollverdau nach Ligation von rp8pcDNA I mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I

Zur weiteren Kontrolle erfolgten die Sequenzierung dieses Klons und der Vergleich mit der bekannten Sequenz für P8.

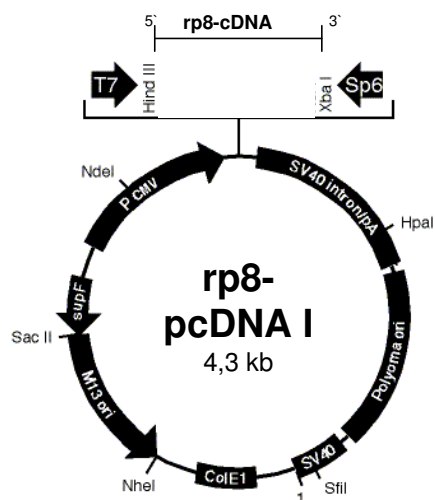


Abb. 29: Darstellung des klonierten Vektors rp8pcDNA I. Die Größe beträgt 4,3 Kilobasen. Die rp8cDNA wurde als ein Xho I / Hind III – Fragment in voller Länge hineinkloniert

### 4.5.3 Klonierung von mp8pcR2.1 TOPO

Zur Klonierung eines Vektors, welcher cDNA von Maus-P8 enthält, wurde der TOPO-TA-KLONING-KIT von Invitrogen verwendet. Zur Gewinnung von Maus-P8 cDNA wurde eine PCR ausgehend von cDNA aus Fettgewebe der Maus, die freundlicherweise von Maria Lazariotou zur Verfügung gestellt wurde, mit spezifischen Primern für Maus-P8 durchgeführt. Die Primersequenz wurde durch Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen für mP8 cDNA ermittelt. Nach 34 Amplifikationszyklen und Analyse auf einem 1,2 % Agarosegel erkennt man bei beiden Ansätzen deutlich eine Bande bei ca. 300 Basenpaaren, die P8 entspricht.

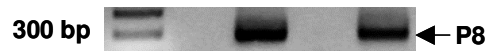


Abb. 30: PCR mit P8-Primern ausgehend von cDNA aus Fettgewebe der Maus

Nach Gelextraktion dieses DNA-Fragments erfolgte die Klonierung in die „multiple cloning site“ des pCR 2.1TOPO-Vektors unter Verwendung des Protokolls von Invitrogen. Nach Vermehrung, Selektionierung und Plasmidpräparation erkennt man im Kontrollverdau mit Eco RI positive Klone, die zur weiteren Überprüfung ansequenziert und mit bekannter Sequenz für mP8 verglichen wurden.

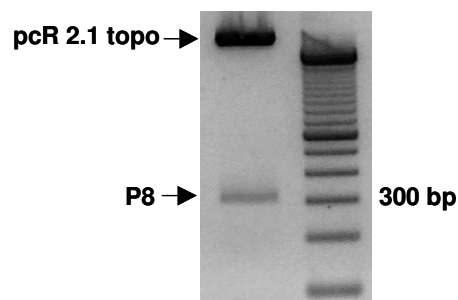


Abb. 31: Kontrollverdau von pCR 2.1 topo mit der Restriktionsendonuklease Eco RI

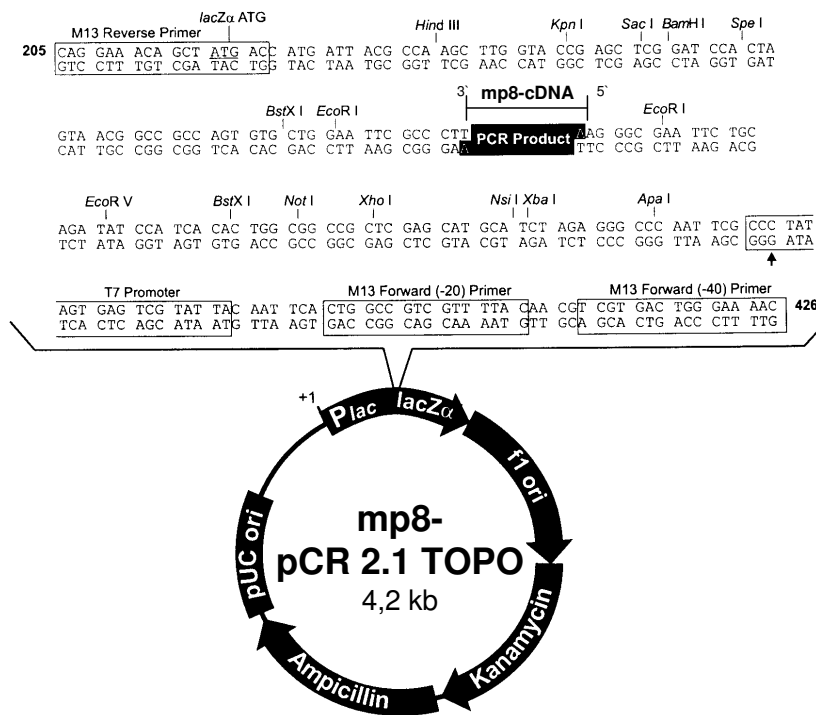


Abb. 32: Darstellung des klonierten Vektors mp8pR 2.1 TOPO. Die Größe beträgt 4,2 Kilobasen. Die mp8cDNA wurde als ein Eco RI-Fragment in voller Länge hineinkloniert.

#### 4.6 Einfluss der P8-Überexpression auf die PDX-1-Genexpression und die Proinsulin-Genexpression in Betazellen des endokrinen Pankreas

Um die Effekte einer Überexpression von P8 näher zu charakterisieren, wurde eine stabile INS-1-Zelllinie verwendet, die freundlicherweise von Martin Gehlen zur Verfügung gestellt wurde. Bei dieser Zelllinie ist es möglich, eine Steigerung der Expression von P8 durch Stimulation mit IPTG zu induzieren. Dieses Prinzip beruht auf dem Modell des lac-Operons, bei dem IPTG als Repressor modifizierendes Element fungiert, das dessen Konfiguration derart verändert, so dass keine Bindung des Repressors an den Operator bzw. Promotor möglich ist. Dadurch kann die RNA-Polymerase an den Promotor binden und die Transkription der nachgeschalteten für P8-kodierenden DNA-Sequenz initiieren. Bei dem von mir verwendeten Klon konnte eine 8 - 10 fache Expressionssteigerung von P8-mRNA induziert werden. Die stabilen INS-1-Zellen wurden mit geeignetem Zellkulturmedium in zwei verschiedenen Versuchsansätzen vorinkubiert. Zum einen erfolgte die Vorinkubation mit

Zellkulturmedium, das eine Glukosekonzentration von 11,1 mM enthielt. Die Zellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen gesplittet und sobald eine 80 %ige Konfluenz erreicht war, wurden sie mit Medium mit 5,6 mM Glukose versehen und mit 5 mM IPTG alle 12 h stimuliert, um eine Überexpression von P8 zu ermöglichen. Nicht-stimulierte Kontrollzellen wurden unter gleichen Bedingungen mitgeführt. Die RNA-Extraktion erfolgte nach 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 h, und nach DNase-1 Verdau wurden je 3 µg RNA in cDNA nach Transkriptionsstart mit Oligo dT umgeschrieben. Die nachfolgende Amplifikation mit 22 Zyklen erfolgte für P8 zusammen mit Beta-Aktin mit spezifischen Primern. Die Proben wurden anhand eines 1,2 %igen Agarosegels analysiert. Man erkennt eine 8 fache Expressionssteigerung für P8 über 72 h bei den Proben, die mit IPTG stimuliert wurden im Vergleich zu den Proben, die nicht stimuliert wurden.

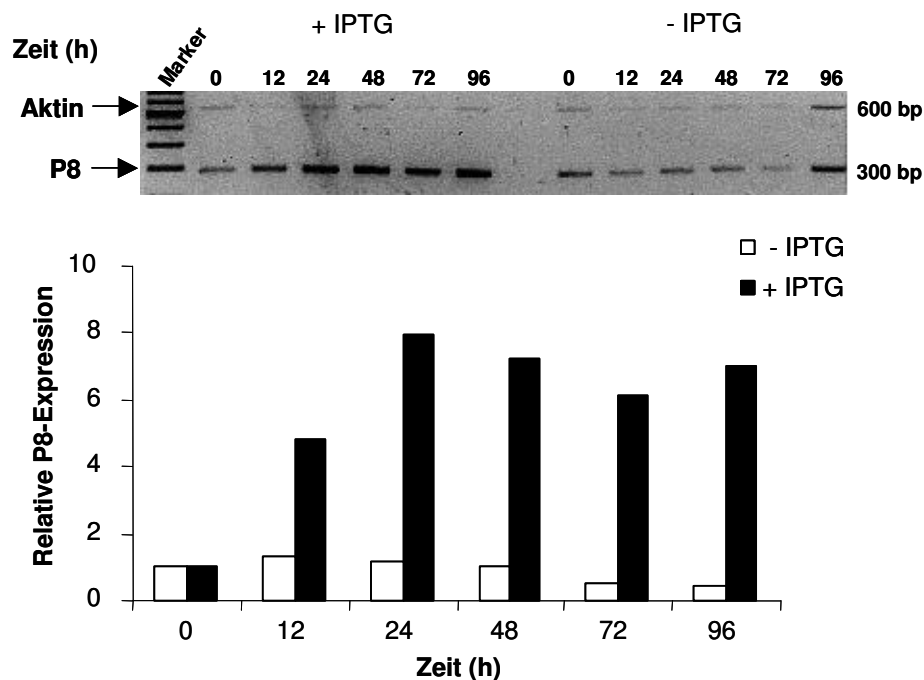


Abb. 33: Zeitabhängige relative p8-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72, 96 h); semiquantitative RT-PCR

Um nun parallel die Expression für PDX-1 und Proinsulin beurteilen zu können, wurde mit der gleichen cDNA einerseits eine PCR mit 28 Zyklen unter Zusatz von 5 % DMSO

mit PDX-1 spezifischen Primern durchgeführt und andererseits eine Amplifikation über 16 Zyklen mit Primern für Proinsulin. Die spezifischen Banden wurden gegen Aktin ausgewertet. Die Expression von PDX-1 bei den mit IPTG stimulierten Zellen ändert sich im Verlauf über 96 h nicht signifikant im Vergleich zum Ausgangswert, bei den Zellen, die nicht mit IPTG stimuliert wurden, erkennt man über diesen Zeitraum einen verstärkten Anstieg der PDX-1-Expression. Bei Betrachtung der Proinsulingenexpression kann man keinen wesentlichen Unterschied zwischen den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen erkennen, da bei beiden Versuchsansätzen ein leichter Anstieg der Expression von Proinsulin vorliegt.

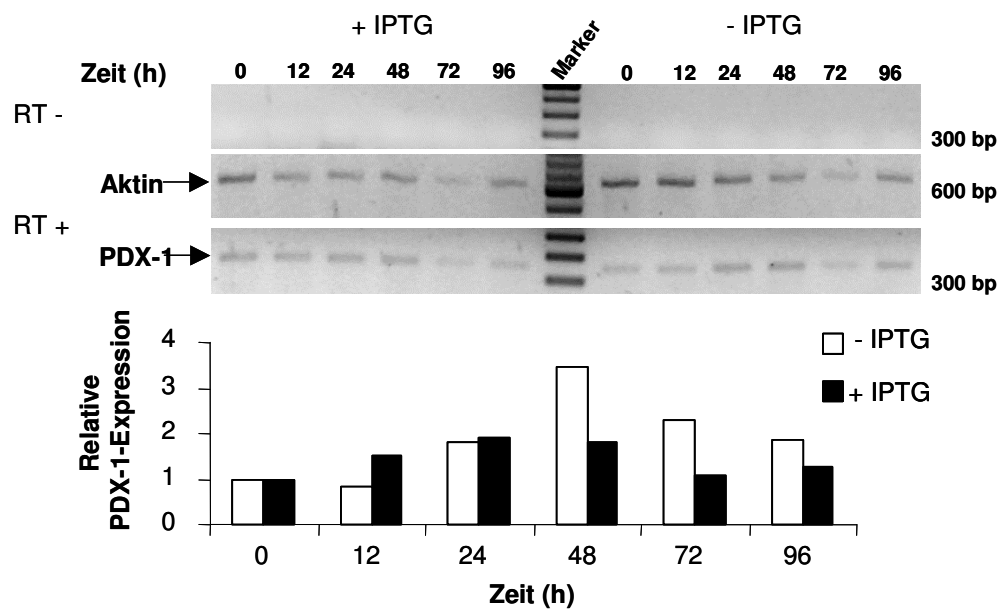


Abb. 34: Zeitabhängige relative PDX-1-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72, 96 h); semiquantitative RT-PCR

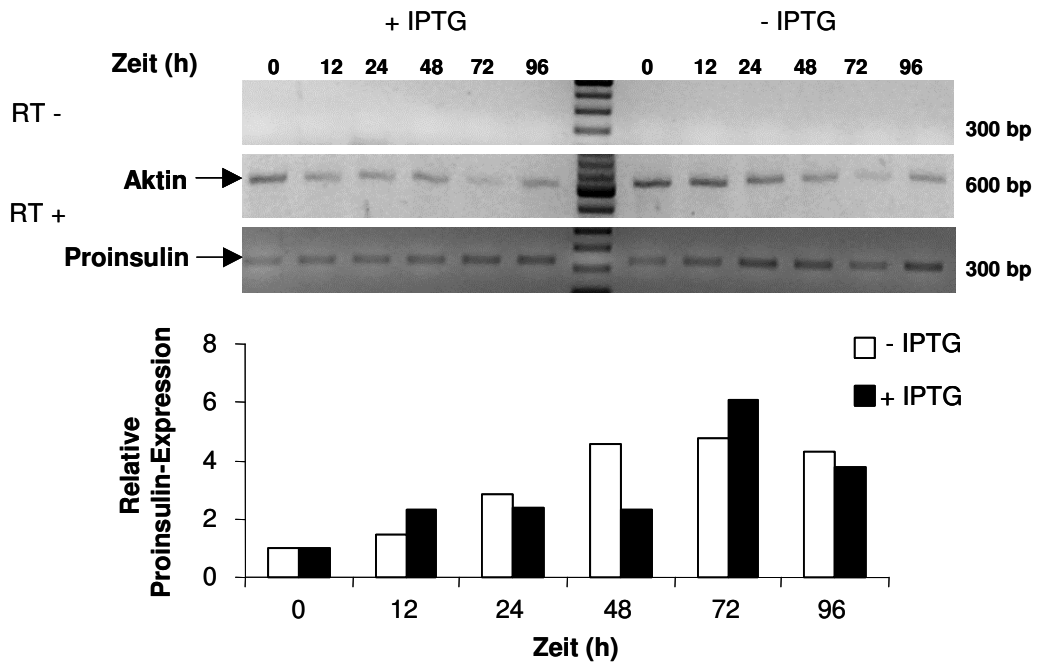


Abb. 35: Zeitabhängige relative Proinsulin-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72, 96 h); semiquantitative RT-PCR

Um störende Einflüsse von FCS oder Glukose zu verringern, wurden in einem weiteren Versuchsaufbau die Zellen in Medium mit 5,6 mM Glukose vorinkubiert und ab IPTG-Stimulation mit Medium gefüttert, das einen FCS-Gehalt von 3,6 % und einen Glukose-Gehalt von 2,5 mM hatte. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben ausgeführt mit der Ausnahme, dass die maximale Inkubationsdauer mit IPTG bei 72 Stunden lag. Nach Auswertung der PCR-Banden am 1,2 %igen Agarosegel erkennt man auch hierbei wiederum einen 8 – 10 fachen Anstieg der P8-Expression bei den mit IPTG stimulierten Zellen.



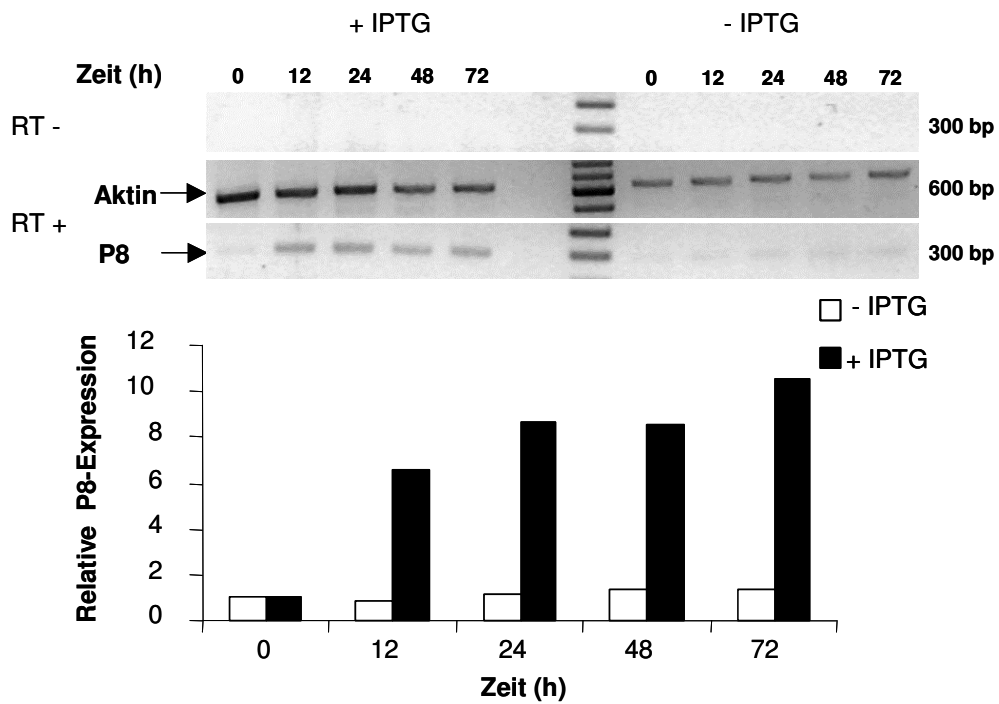


Abb. 36: Zeitabhängige relative P8-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

Die Expression von PDX-1 bleibt sowohl bei den stimulierten wie auch bei den nicht-stimulierten Zellen relativ unverändert im Vergleich zum Ausgangswert, und auch in Bezug auf die Proinsulingenexpression wird kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, die P8 überexprimieren und den nicht-stimulierten Zellen erkennbar.

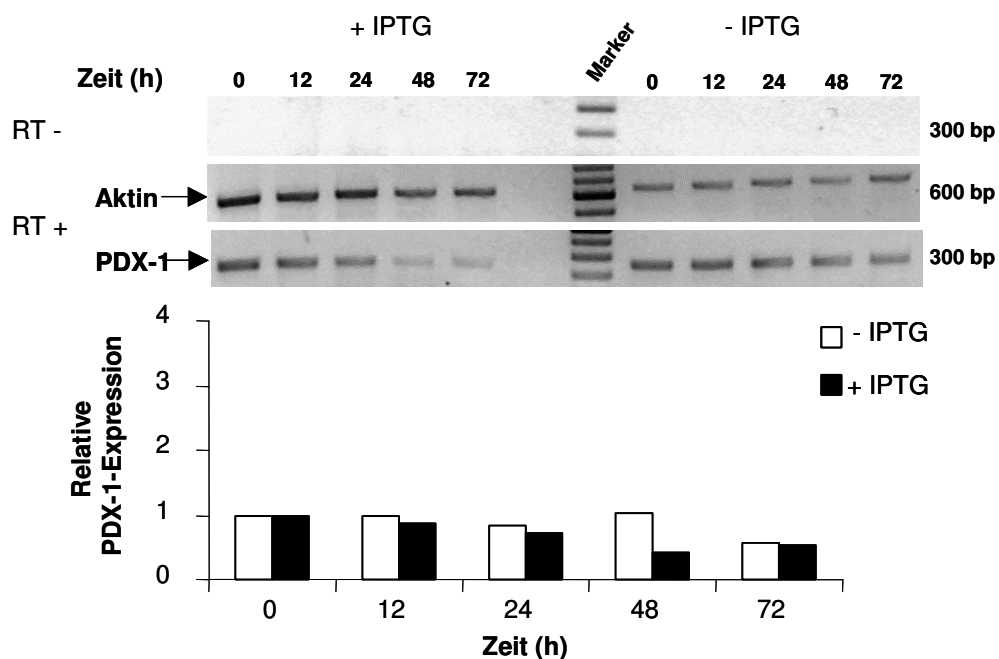


Abb. 37: Zeitabhängige relative PDX-1-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

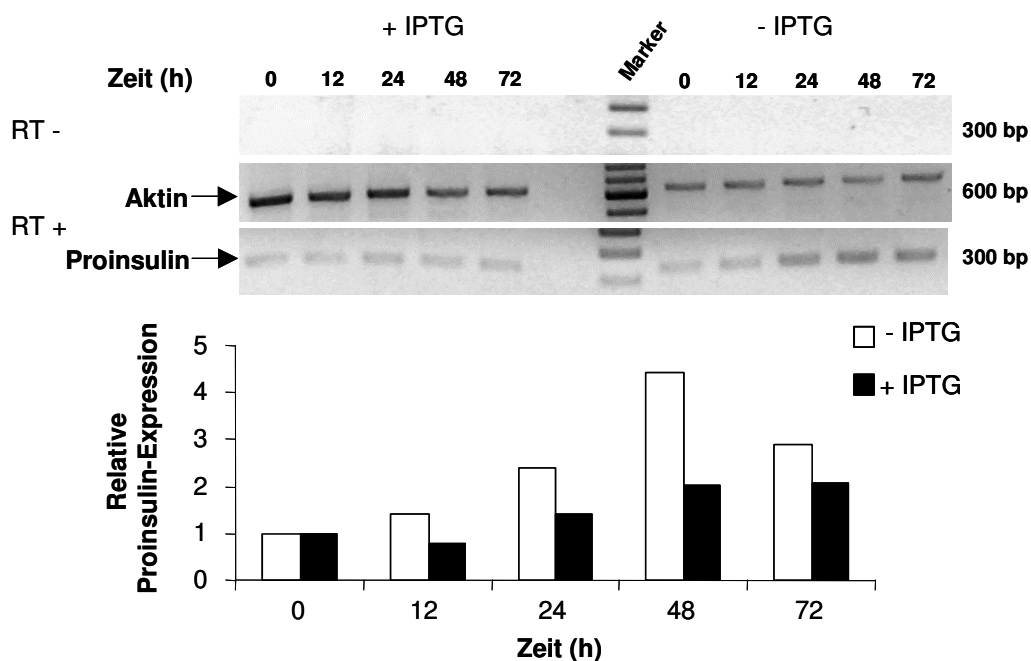


Abb. 38: Zeitabhängige relative Proinsulin-mRNA-Expression in stabilen INS-1-Zellen mit/ohne IPTG-Stimulation (0, 12, 24, 48, 72 h); semiquantitative RT-PCR

#### 4.6.1 Transiente Transfektion (Luziferase-Assays)

##### 4.6.1.1 Einfluss von P8 auf den mPDX-1-Promotor

Um zu prüfen, ob das Protein P8 Einfluss auf den PDX-1-Promotor ausübt, wurden in COS-7-Zellen transiente Kotransfektionen mit dem Vektor rp8pcDNA3.1+ und Konstrukten des mPDX-1-Promotors mit jeweils entsprechenden Leervektoren durchgeführt. Zur Orientierung wurden in der ersten Versuchsreihe unterschiedliche Mengen des Vektors rp8pcDNA3.1+ zusammen mit dem -1700mPDX-1-Konstrukt kotransfiziert. Nach 72 h erfolgte die Messung der relativen Luziferaseaktivität, welche die Aktivierung des Promotors repräsentiert.

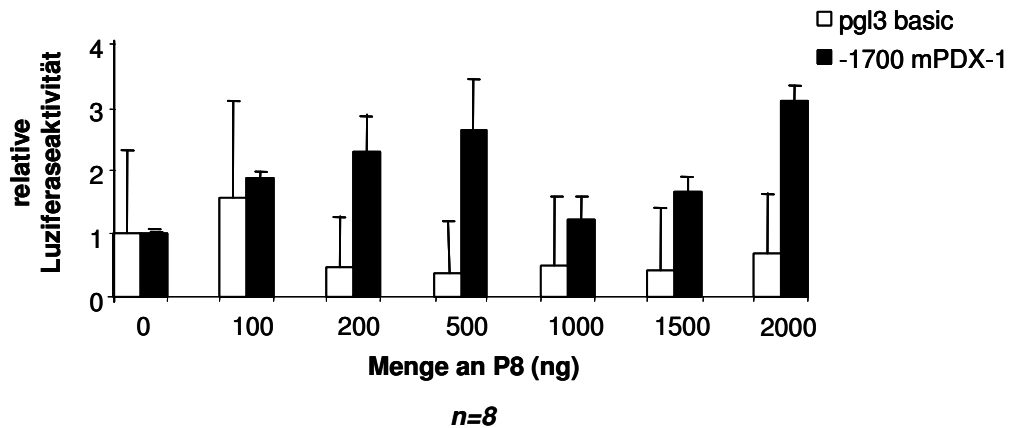


Abb. 39.: Transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit rp8pcDNA3.1+/Leervektor und -1700mPDX-1/Leervektor; Zellextrakt nach 72 h

Eine Verstärkung der Luziferaseaktivität zeigt sich bei den Zellen, welche mit rp8pcDNA3.1+ und dem -1700mPDX-1-Konstrukt kotransfiziert wurden im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche mit dem Leervektor transfiziert wurden. Die stärkste Aktivierung des PDX-1-Promotorkonstrukts findet sich bei Verwendung von 2000 ng rp8pcDNA3.1+, wobei auch hier keine signifikante Aktivierung ( $< 4 \times$ ) vorliegt. In weiteren Versuchsreihen wurden die mPDX-1-Konstrukte -1700, -900, -310 und -230 wie auch der entsprechende Leervektor pGL3basic verwendet und mit unterschiedlichen Mengen des Vektors rp8pcDNA3.1+ (2  $\mu$ g; 1  $\mu$ g; 0,5  $\mu$ g) und dem entsprechenden Leervektor pcDNA3.1+ kotransfiziert. Die Gewinnung des Zellextraktes und Messung der Luziferaseaktivität erfolgte ebenfalls nach 72 h.

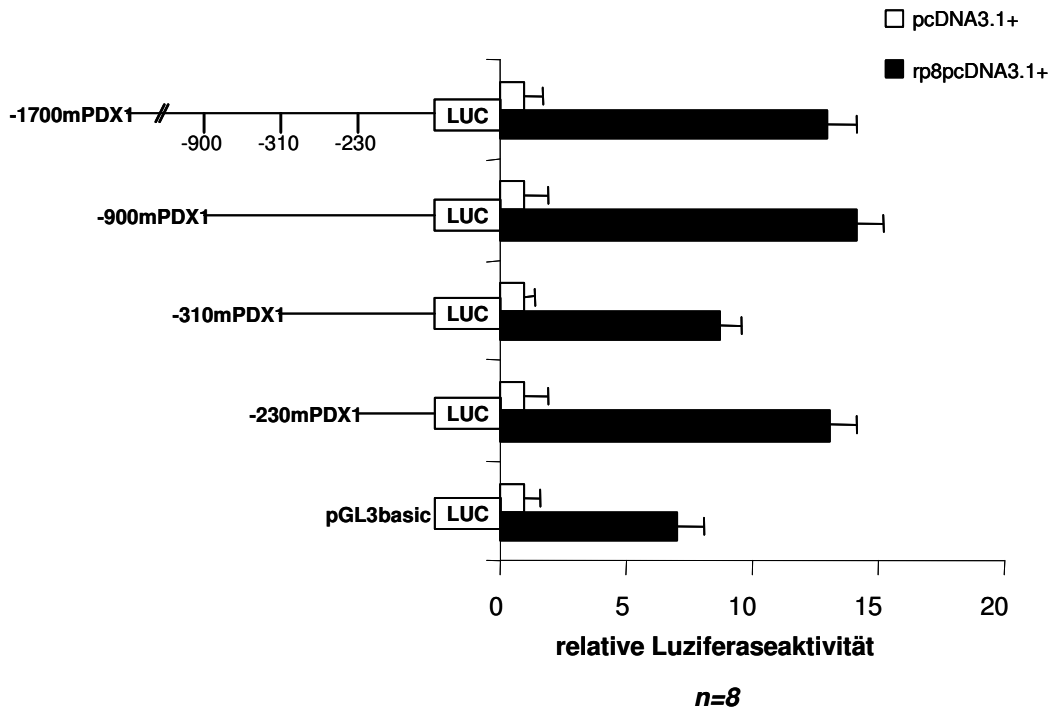


Abb. 40: Transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit 2 µg rp8pcDNA3.1+/ Leervektor und Konstrukten des mPDX-1-Promotors/ Leervektor; Zellextrakte nach 72 h

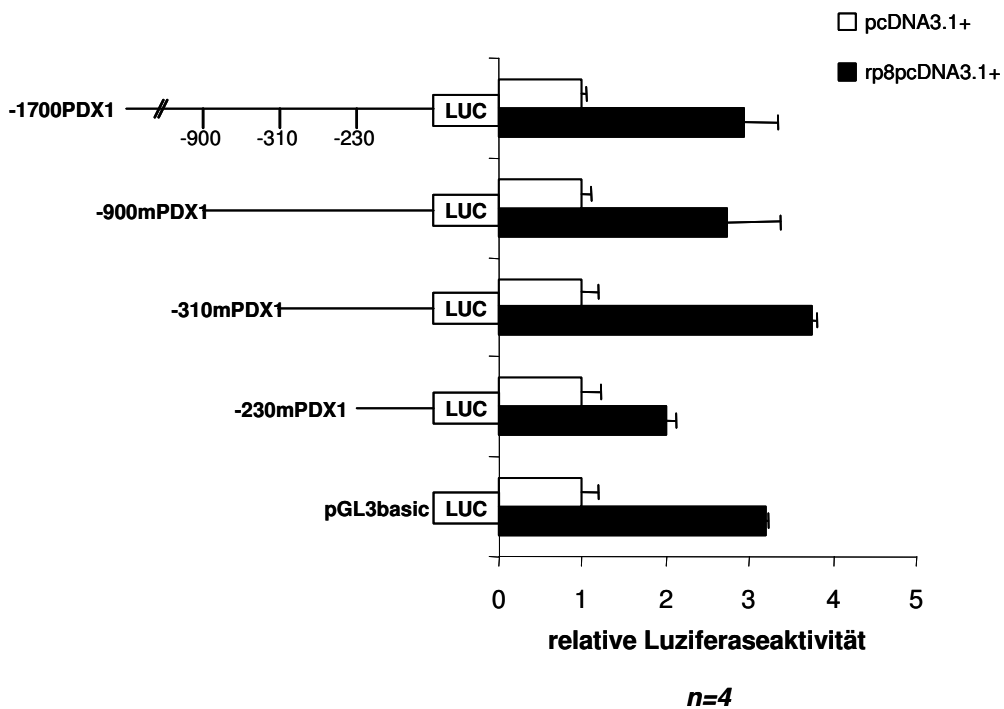


Abb. 41: Transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit 1 µg rp8pcDNA3.1+/ Leervektor und Konstrukten des mPDX-1-Promotors/ Leervektor; Zellextrakte nach 72 h

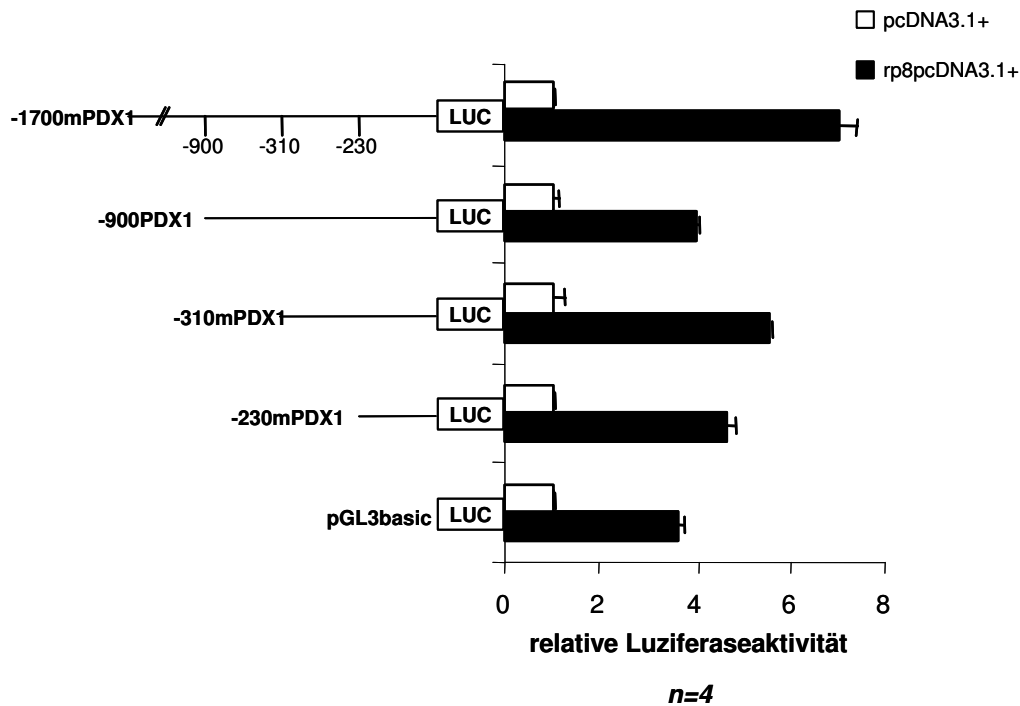


Abb. 42.: Transiente Kofransfektion von COS-7-Zellen mit 0,5 µg rp8pcDNA3.1+/ Leervektor und Konstrukten des mPDX-1-Promotors / -Leervektor; Zellextrakt nach 72 h

Bei diesen Messergebnissen ergibt sich unabhängig von der Menge des verwendeten rp8pcDNA3.1+ -Vektors eine starke Aktivierung des Leervektors pGL3basic, so dass keine signifikante Aktivierung der Konstrukte des mPDX-1-Promotors erkennbar ist. In einer weiteren Versuchsreihe wurden zur Transfektion stabile INS-1-Zellen verwendet, welche durch Stimulation mit IPTG eine Steigerung der P8-Expression aufweisen. Diese Zellen wurden mit den oben genannten mPDX-1-Konstrukten transient transfiziert und über 72 h mit IPTG stimuliert. Nicht-stimulierte Kontrollzellen wurden zum Vergleich mitgeführt. Die Gewinnung der Zellextrakte und Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 72 h.

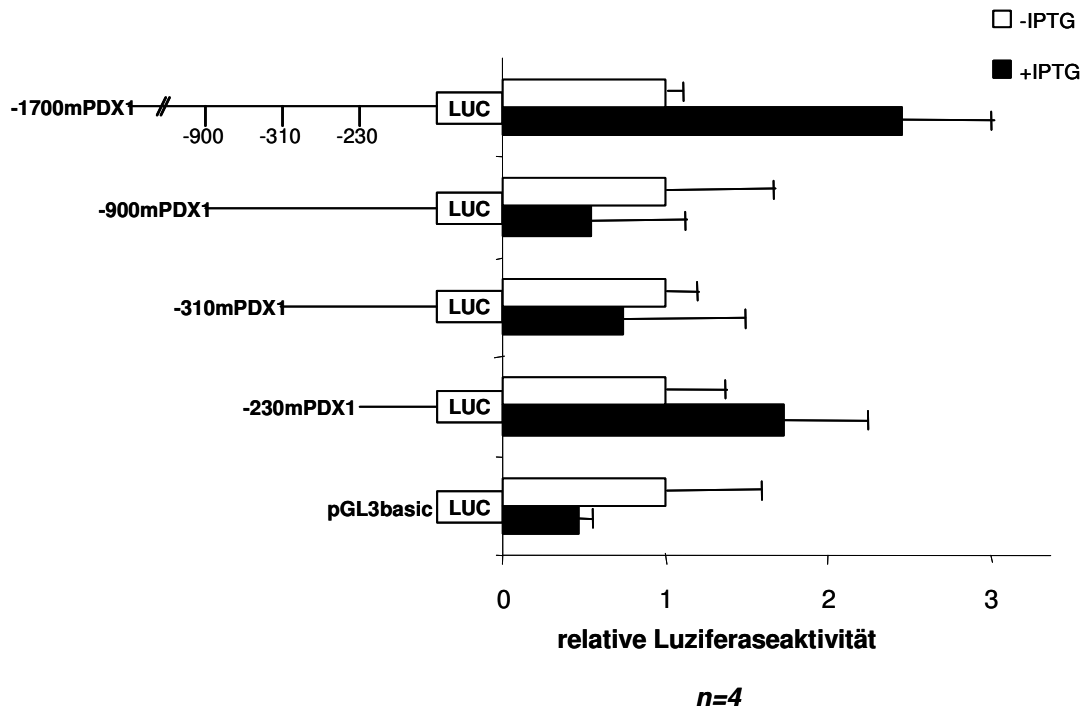


Abb. 43: Transiente Kotransfektion von stabilen INS-1-Zellen mit Konstrukten des PDX-1-Promotors / Leervektor; Stimulation der Zellen über 72 h +/- IPTG

Man erkennt anhand dieser Ergebnisse einen leichten Anstieg der Luziferaseaktivität bei den Zellen, welche mit dem -1700mPDX-1-Konstrukt transfiziert wurden und gleichzeitig P8 überexprimieren, doch auch dieser Anstieg gilt nicht als signifikant. Diese Ergebnissen lassen keine Aktivierung des PDX-1-Promotors durch P8 erkennen.

#### 4.6.1.2 Einfluss von P8 auf den Insulinpromotor

Um den Einfluss von P8 auf den Insulinpromotor zu erkennen, wurden INS-1-Zellen mit dem -412rINS-1-Promotorkonstrukt, unterschiedlichen Mengen an P8 (0-2000 ng) in Form des rp8pcDNA3.1+ -Vektors und entsprechenden Leervektoren kotransfiziert. Die Gewinnung der Zellextrakte und Messung der Luziferaseaktivität erfolgte nach 72 h.

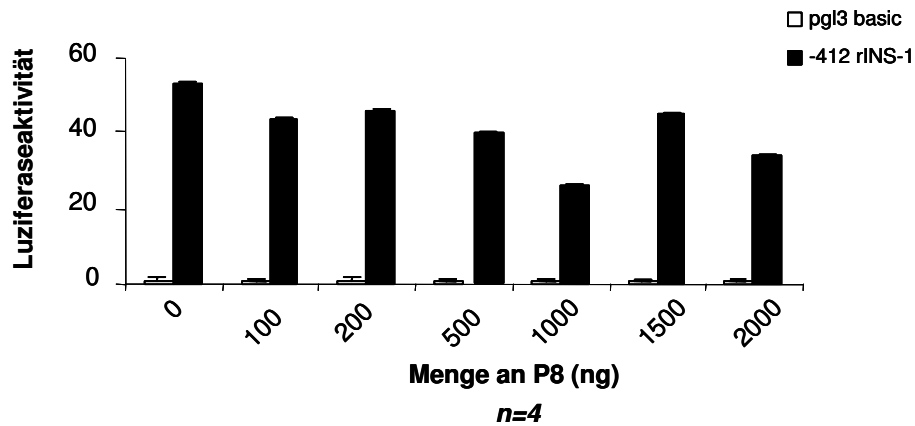


Abb. 44.: Transiente Kotransfektion von INS-1-Zellen mit rp8pcDNA3.1+/Leervektor und -412rINS-1/ Leervektor; Zellextrakt nach 72 h

Hierbei wird eine starke Grundaktivierung des -412rINS-1-Promotors deutlich bei fehlender signifikanter Aktivitätssteigerung unter Einfluss von P8. In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die transiente Kotransfektion in COS-7-Zellen mit 1,5 µg rp8pcDNA3.1+ und dem -412rINS-1-Konstrukt mit entsprechenden Leervektoren.

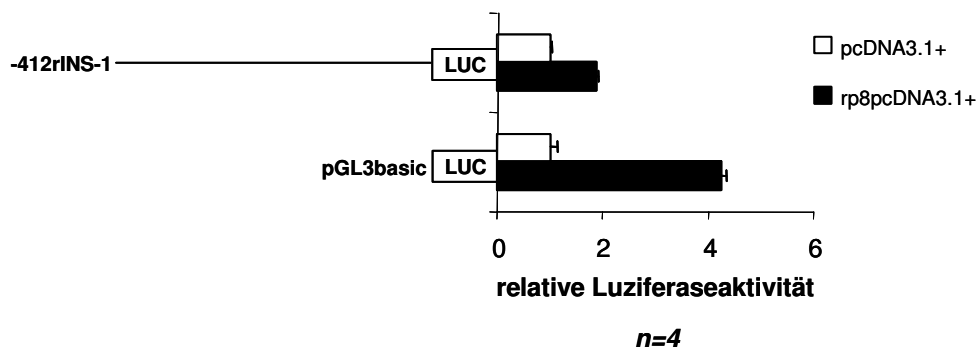


Abb. 45.: Transiente Kotransfektion von COS-7-Zellen mit 1,5 µg rp8pcDNA3.1+ / Leervektor und -412rINS-1 / -Leervektor; Zellextrakt nach 72 h

Die Messergebnisse der Luziferaseaktivität nach 72 h lassen keine Aktivitätssteigerung des -412rINS-1-Promotorkonstruktes durch P8 erkennen. Zur Sicherung des Ergebnisses wurden transiente Transfektionen des -412rINS-1-Promotorkonstruktes und Leervektors in stabilen INS-1-Zellen durchgeführt, welche durch Stimulation mit IPTG P8 überexprimieren.

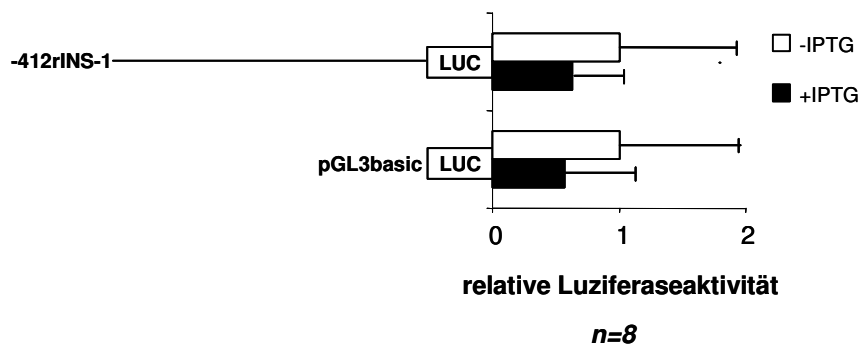


Abb. 46.: transiente Transfektion von stabilen INS-1-Zellen mit -412rINS-1 / Leervektor; Stimulation der Zellen über 72 h +/- IPTG

Nach Stimulation der Zellen über 72 h mit IPTG ist kein Anstieg der Luziferaseaktivität zu vermerken, so dass man daraus schließen kann, dass die Überexpression von P8 nicht zu einer Aktivitätssteigerung des -412rINS-1-Promotorkonstruktes führt.

#### 4.7 Einfluss der P8-Überexpression auf die Insulinbiosynthese und die Insulinsekretion in Betazellen (ELISA)

Um den Einfluss einer Überexpression von P8 auf die Insulinbiosynthese und die Insulinsekretion in Beta-Zellen beurteilen zu können, wurde der Insulingehalt in den Zellen wie auch im Zellkulturmedium, in dem die Zellen inkubiert waren, mittels eines spezifischen Enzym-Immuno-Assay gemessen. Zum einen wurden stabile INS-1-Zellen mit 5 mM IPTG über 96 Stunden stimuliert, so dass eine Überexpression von P8 erfolgen konnte, zum anderen wurden nicht-stimulierte Kontrollzellen mitgeführt. In der nachfolgenden Abbildung sind die Messungen des Insulingehalts im Medium im Vergleich von Stimulierten und nicht stimulierten Zellen dargestellt.



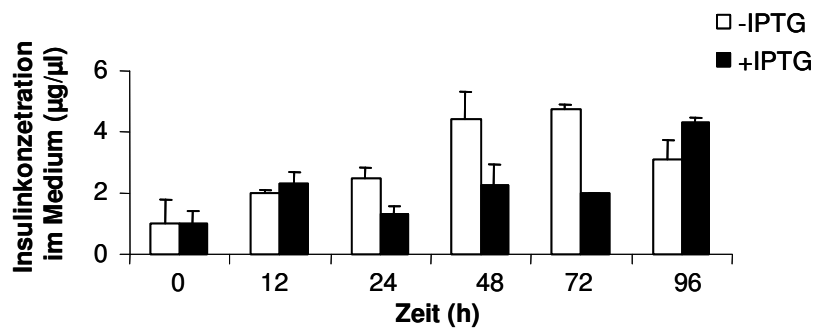


Abb. 47: Messung der Insulinkonzentration mittels ELISA im Medium von stabilen INS-1-Zellen nach Stimulation +/- IPTG

Man erkennt eine Tendenz dazu, dass die Zellen, die P8 überexprimieren, nach 96 Stunden netto mehr Insulin sezernieren als die Kontrollzellen. Im Folgenden sind die Messungen des Insulingehaltes in den Zellen graphisch dargestellt.

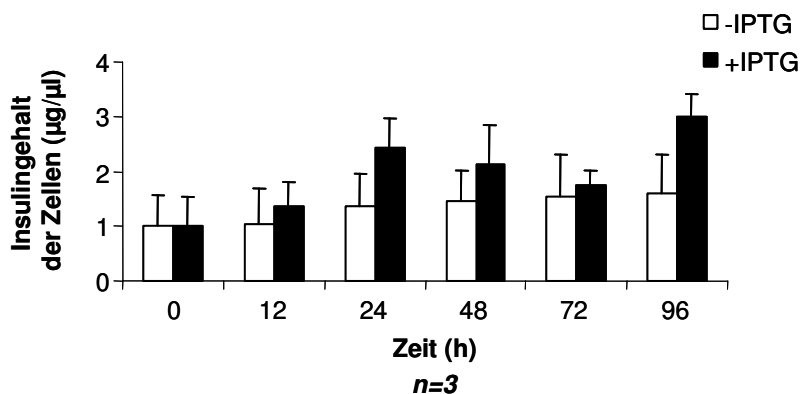


Abb. 48: Messung des Insulingehalts mittels ELISA von stabilen INS-1-Zellen nach Stimulation +/- IPTG

Bei diesen Messungen zeigt sich deutlich, dass die stimulierten Zellen netto einen höheren Insulingehalt aufweisen als die nicht stimulierten Kontrollzellen. Die Messungen wurden nicht in Bezug auf die Einzelzelle durchgeführt, sondern es handelte sich hierbei um Endpunktmessungen, welche einen kumulativen Effekt darstellen. Wichtig ist hierbei herauszustellen, dass die Zellen, die verstärkt P8 exprimieren, nicht entdifferenzieren, sondern ihre Fähigkeit, Insulin zu produzieren und zu sezernieren beibehalten.

## 5 Diskussion

Die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie des Diabetes mellitus sowie die Optimierung bereits bestehender therapeutischen Möglichkeiten ist von großer Bedeutung für die Vermeidung diabetischer Komplikationen und die Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten. Die Pathogenese des Diabetes mellitus beruht im Wesentlichen auf der autoimmunen Destruktion der Betazelle des endokrinen Pankreas (Typ 1) sowie deren Dysfunktion (Typ 2). Neben der Inseltransplantation stellt die Zelltherapie eine nahezu kausale Therapiemöglichkeit dar, welche die Betazelle und deren Funktion ersetzen könnte. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen ist die Anwendbarkeit der Inseltransplantation stark eingeschränkt. Daher besteht ein großer Bedarf an alternativen Ressourcen für glukoseresponsive insulinsezernierende Zellen, welche für die Transplantation geeignet wären. Der Versuch der Expansion humaner Betazellen schlug bisher aufgrund der Inkompetenz der Zellen zur geregelten Insulinproduktion und möglichen Tumorbildung fehl. Neuere Ansätze verfolgen die Verwendung von humanen embryonalen bzw. gewebsspezifischen duktafen und intrainsulinären Stammzellen des endokrinen Pankreas als Ausgangsgewebe zum Betazellersatz [14], [24], [86]. Embryonale Zellen können in vitro zu insulinproduzierenden Zellen differenzieren, wohingegen eine Produktion von ausreichenden Mengen an funktionsfähigen Betazellen bisher nicht gelungen ist. Auch gewebsspezifische duktafe und intrainsulinäre Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas konnten identifiziert und in vitro kultiviert werden [15]. Unter geeigneten Bedingungen erfolgte auch hierbei eine Differenzierung zu insulinproduzierenden Zellen, obwohl eine ausreichende Expansion der Zellen nicht erreicht werden konnte. Daher ist es notwendig, molekulare Mediatoren zu identifizieren und zu charakterisieren, welche die Proliferation von Betazellen des endokrinen Pankreas positiv beeinflussen. Hierdurch wäre es möglich, insulinproduzierende Zellen zu expandieren und therapeutisch einzusetzen.

## 5.1 P8 als proliferationsinduzierendes Protein

Das Protein P8 könnte einen derartigen molekularen Mediator darstellen. Im Rahmen eines differenziellen Genscreenings im Rattenmodell wurde P8 erstmals nach Induktion einer experimentellen Pankreatitis kloniert [74]. Bei diesem Modell kommt es neben den inflammatorischen Prozessen ebenfalls kurzfristig zu einer unspezifischen Zellproliferation. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde eine starke P8-Expression festgestellt. Aufgrund der ebenfalls verstärkten Expression von P8 sowohl bei der Regeneration als auch bei der Entwicklung des Pankreas, wäre die Expressionssteigerung im Pankreatitismodell ebenfalls durch eine Proliferationsinduktion statt durch inflammatorischen Prozesse erklärbar. Die Hypothese von P8 als proliferationsassoziiertes Protein wurde durch nachfolgende Versuche bekräftigt, bei welchen in verschiedenen Zelllinien eine unspezifische Zellproliferation durch P8-Expression erreicht werden konnte [74]. Das Protein P8 wird nicht pankreasspezifisch exprimiert, sondern findet sich ebenfalls in verschiedenen Organen wie Speicheldrüsen, Leber, Magen, Kolon, Niere und Herz. In dieser Arbeit konnte anhand von Untersuchungen an extrahierter RNA aus INS-1-Zellen, AR42-J-Zellen und humanen Pankreasinseln gezeigt werden, dass P8 sowohl in insulinproduzierenden Betazellen als auch in Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas exprimiert wird. Diese nicht-organspezifische Expression des Proteins könnte auf seine Funktion als genereller proliferationsinduzierender zellulärer Faktor hinweisen. Die Analyse der Proteinstruktur lässt vermuten, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte, obwohl es im Vergleich zu anderen Transkriptionsfaktoren relativ klein ist (ca. 26 kD). Es zeigt Strukturhomologie zu einigen Transkriptionsfaktoren der Homeodomain-Familie und weist gleichzeitig ein putatives nukleäres Lokalisationssignal auf [74]. Um die mögliche zelluläre Lokalisation von P8 zu überprüfen, wurde unter Verwendung des in dieser Arbeit erstellten spezifischen P8-Antiserums eine immunzytochemische Färbung von INS-1-Zellen durchgeführt, welche P8 überexprimieren. Hierbei zeigte sich eine deutlich stärkere Anfärbung der Kerne der P8 überexprimieren Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche nur eine basale P8-Expression aufweisen. Um Färbungsartefakte durch die basale P8-Expression zu vermeiden, wäre es notwendig, weitere Untersuchungen bezüglich der

zellulären P8-Lokalisation durchzuführen, die unabhängig von der Menge des exprimierten Proteins sind. Erschwert wurde die Interpretation der Ergebnisse durch unspezifische Hintergrundfärbung des Primärserums, weshalb sensitivere Methoden zur Verifizierung der zellulären Lokalisation von P8 notwendig sind.

## **5.2 Glukoseabhängige Regulation von P8 in INS-1- und AR42-J-Zellen**

Die insulinsezernierende Betazelllinie INS-1 stellt ein etabliertes Zellkulturmodell für molekulare Untersuchungen der Betazellfunktion dar, obwohl sie primäre Betazellen nicht vollständig repräsentiert [87]. Studien an primären Betazellen sind bisher aufgrund der eingeschränkten Isolierung, Aufbereitungsmöglichkeiten und in-vitro-Kultivierung nur begrenzt möglich [88], [89], [90]. Die molekularen Mechanismen, welche die Amplifikation von Betazellen steuern, sind weitgehend unbekannt. Für eine therapeutische Anwendung von Betazellen als Gewebeersatz bei Diabetes mellitus, wäre eine induzierbare Expansion der Zellen notwendig, um ausreichend Material zur Verfügung zu haben. Ein bekannter Stimulus für die Insulinsekretion in Betazellen als auch für die Betazellreplikation ist Glukose [91], [92]. Um den Einfluss trophischer Faktoren für Betazellen auf die P8-Expression zu analysieren, wurden im Zellkulturmodell INS-1-Zellen mit hohen Glukosekonzentration (25 mM) über 48 Stunden inkubiert und die Intensität der Expression von P8 mittels RNA-Extraktion und PCR ermittelt. Hierbei zeigt sich ein deutlicher glukoseinduzierten Anstieg der P8-Expression. Im Vergleich dazu findet man bei niedrigen Glukosekonzentrationen (5,6 mM) einen Rückgang der P8-Expression. Nach dem bisherigen Wissensstand geht man davon aus, dass die Neogenese von adulten Betazellen zum Teil in ähnlicher Weise gesteuert wird, wie die Organogenese des endokrinen Pankreas. In diesem Zusammenhang wurden eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Hormonen, Nährstoffen und Signaltransduktionsmolekülen identifiziert, die an den Steuerungsvorgängen der Pankreasentwicklung beteiligt sind [66], [65]. Es wäre somit möglich, dass P8 ebenfalls einen Transkriptionsfaktor repräsentiert, der unter dem Einfluss von Glukose zur Amplifikation von Betazellen führen könnte. Bei dem Zellkulturmodell für duktaile Vorläuferzellen des Pankreas, AR42-J, konnte dieser Effekt der Glukosewirkung jedoch nicht beobachtet werden. AR42-J-Zellen haben ihren

Ursprung im Pankreasgangepithel und verfügen über die Eigenschaften duktaler Vorläuferzellen. Sie stellen ein amphikrines Zellmodell dar, da sie sowohl Eigenschaften der exokrinen Azinuszellen besitzen als auch der neuroendokrinen Zellen [93]. Wachstumsfaktoren wie Aktivin, Betazellulin und GLP-1 können die Differenzierung in endokrine insulinproduzierende Zellen bewirken [94], [95]. Ohne diese Faktoren sind die Zellen jedoch nicht ausdifferenziert und besitzen keine Glukoseresponsivität. Dieses wäre eine mögliche Erklärung für die fehlenden Effekte von Glukose auf die P8-Expression in AR42-J - Zellen.

### **5.3 GLP-1 abhängige P8-Expression in INS-1 und AR42-J-Zellen**

Einen weiteren trophischen Faktor für Betazellen, der Einfluss auf die Regulation der P8-Expression nimmt, stellt das Inkretinhormon GLP-1 dar. Es stimuliert im endokrinen Pankreas die Genexpression, Synthese und Sekretion des Insulins in Abhängigkeit von Glukose [55-58]. Des Weiteren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es die Expression des Homeodomaintranskriptionsfaktors PDX-1 stimuliert und gleichzeitig zu einer Expansion von Inselzellen führt [19], [53]. Xu et al. wiesen ebenfalls den positiven Einfluss auf die Betazellneogenese als auch auf die Proliferation der Progenitorzellen des Pankreas nach [73]. GLP-1 aktiviert synergistisch mit Glukose die Genexpression von Transkriptionsfaktoren, die bei der Betazellproliferation und Differenzierung involviert sind. Sowohl in INS-1-Zellen als auch in AR42-J-Zellen konnte eine Induktion der P8-Expression durch GLP-1 gezeigt werden. In INS-1-Zellen sieht man bei Inkubation mit GLP-1 einen kontinuierlichen Anstieg der P8-Expression über 72 Stunden, bei den AR42-J-Zellen ist dieser Effekt nur innerhalb der ersten 24 Stunden deutlich sichtbar. Im weiteren Verlauf kommt es in letzterem Modell wieder zu einer leichten Abnahme der vorerst gesteigerten P8-Expression. Dieser Effekt in den duktaalen Vorläuferzellen könnte mit der Instabilität des synthetischen Peptids GLP-1 zusammenhängen oder aber auch auf unterschiedlichen Regulationsmechanismen in den noch undifferenzierten Zellen beruhen, die bislang noch nicht vollständig geklärt sind. Einflüsse von GLP-1 auf AR42-J-Zellen sind bisher noch nicht hinreichend analysiert worden. Zouh et al. konnten jedoch zeigen, dass AR42-J-Zellen unter dem Einfluss von GLP-1 in insulinproduzierende Betazellen differenzieren können [95]. Die Inkubation

von AR42-J-Zellen mit GLP-1 führte neben der Differenzierung zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Spiegel und einem Anstieg der Zellproliferation innerhalb der ersten 24 Stunden mit nachfolgender Inhibition. Dieses Proliferationsmuster könnte den primären Anstieg der Expression des proliferationsassoziierten Proteins vor allem in den ersten 24 Stunden und den nachfolgenden Rückgang im Verlauf von 72 Stunden in AR42-J-Zellen unter dem Einfluss von GLP-1 erklären. Somit wird die Expression von P8 in INS-1-Zellen, als Modell für insulinproduzierende Betazellen, und in AR42-J-Zellen durch trophische Faktoren wie Glukose und GLP-1 reguliert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass P8 ebenfalls einen Transkriptionsfaktor darstellt und als Mediator der Glukose und GLP-1 vermittelten Zellproliferation in Betazellen und zum Teil auch in deren Vorläuferzellen fungiert.

#### **5.4 P8 und betazellspezifische Genexpression**

Eines der Probleme bei der Expansion differenzierter Zellen stellt die proliferationsinduzierte Dedifferenzierung dar. Daher wurde in dieser Arbeit die betazellspezifische Genexpression im Hinblick auf eine Überexpression des potentiell proliferationsinduzierenden Proteins P8 untersucht. Der Fokus lag hierbei auf PDX-1 und Proinsulin, zwei sehr wichtigen betazellspezifischen Differenzierungsmarkern. Der Transkriptionsfaktor PDX-1 ist ein zentraler Regulator der Pankreasentwicklung und betazellspezifischen Genexpression [36-38], [96]. PDX-1 reguliert viele Gene, die für die Betazellfunktion und Identität wichtig sind. Hierzu zählt die glukoseinduzierte Regulation des Insulinpromotors [35], [39] als auch des Glukosetransporters GLUT 2 [40], der Glukokinase [41] und des „Islet amyloid polypeptides“ [42]. Seine Bedeutung in der Embryogenese des endokrinen Pankreas wurde primär am Tiermodell deutlich, bei dem homozygote Mutationen in dem für PDX-1 kodierenden Gen zu einer Pankreasagenese führten und heterozygote Mutationen eine Insulinsekretionsstörung mit resultierendem Diabetes mellitus zur Folge hatten [68], [97]. Auch bei Menschen sind derartige Mutationen im PDX-1 Gen beschrieben worden, welche einen ähnlichen Phänotyp mit Pankreasagenese und Diabetes mellitus bewirken [37], [67], [69], [98], [99]. Diese bekannten Eigenschaften von PDX-1 betonen seine Bedeutung für den

Phänotyp und die Funktion der insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, dass Betazellen unter dem Einfluss verschiedener Faktoren sowie bei Zellproliferation die Expression des PDX-1-Gens nicht verlieren. Molekulargenetische Untersuchungen an Betazellen (INS-1) mit stabiler P8-Überexpression zeigten auf RNA-Ebene keine signifikante Änderung der PDX-1- und Proinsulin-Genexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass eine mögliche Proliferationsinduktion durch das Protein P8 nicht zu einer Veränderung der betazellspezifischen Differenzierungsmarker führt. Eine Entdifferenzierung der Zellen ist somit nicht zu erwarten. Obwohl sich auf RNA-Ebene keine Änderung der Expression von PDX-1 und Proinsulin in Betazellen nachweisen lässt, wurde eine mögliche Regulation der Promotoraktivität unter dem Einfluss von P8 näher betrachtet.

Die Regulation des PDX-1-Gens besteht aus einem sehr komplexen Zusammenspiel von Hormonen (v.a. GLP-1, TGF $\beta$ ) [19], [53], [54], [61], Nährstoffen (Glukose) [33], [45] und Transkriptionsfaktoren (HNF3 $\beta$ , HNF1a, SP1/3, E47/Neuro D) [100], [101], welche die Expression von PDX-1 steigern und seine DNA-Bindungsaktivität wie auch das Transaktivierungspotential verstärken. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte PDX-1-Genaktivierung mit der Betazellneogenese aus Pankreasgangzellen assoziiert ist, und die Stimulation durch GLP-1 sowohl zu einer verstärkten PDX-1-Expression als auch zu einem Anstieg der Zellproliferation in Pankreasinseln führt [19], [53]. Es wäre daher denkbar, dass auch P8 als Transkriptionsfaktor in den Komplex der GLP-1/PDX-1 getriggerten Zellproliferation involviert ist. Unter Verwendung verschiedener Zellkulturmodelle konnte anhand von Transfektionsexperimenten jedoch keine signifikante Änderung des Aktivitätszustandes des PDX-1-Promotors und des Insulinpromotors durch das Protein P8 nachgewiesen werden. Das Protein P8 scheint somit keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von PDX-1 und Proinsulin auszuüben. Von besonderer Bedeutung ist jedoch der Erhalt dieser betazellspezifischen Differenzierungsmarker unter dem Einfluss von P8.

## 5.5 P8 und Betazellfunktion

Ein weiteres wichtiges Element bei Untersuchungen an Betazellen und deren Expansion stellt neben der betazellspezifischen Genexpression der Erhalt der Betazellfunktion dar, insbesondere der Insulinproduktion und -sekretion [7]. Durch eine Überexpression von P8 konnten keine negativen Auswirkungen auf die Funktion der Betazelle detektiert werden. Hierfür wurde der Insulingehalt der Zellen mittels ELISA unter dem Einfluss einer verstärkten Expression von P8 bestimmt. Über einen Zeitraum von 96 h lässt sich bei den Zellen, die P8 verstärkt exprimieren, netto ein tendenziell höherer Insulingehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen messen. Die Messungen wurden als Endpunktmessungen ohne Berücksichtigung der Zellzahl durchgeführt, weshalb kein Rückschluss auf die Leistungsfähigkeit der einzelnen Zelle möglich ist. Es stellt vielmehr einen kumulativen Effekt dar, der vermuten lässt, dass die Zellen unter dem Einfluss einer gesteigerten P8-Expression ihre spezifische Funktion der Insulinproduktion und -sekretion nicht verlieren und somit nicht dedifferenzieren. Eine quantitative Aussage bezüglich der Insulinproduktion und -sekretion ist in diesem Zellkulturmodell nur eingeschränkt möglich, da die basale Insulinfreisetzung der Betazelllinie INS-1 im Vergleich zu der nativen Betazelle stark reduziert ist. Gleichzeitig fällt ein induzierter Anstieg der Insulinfreisetzung zum Beispiel durch Glukose ebenfalls deutlich geringer aus [87], [102]. In diesen Messungen erkennt man im Verlauf über 96 h einen tendenziellen Anstieg des Insulingehaltes unter dem Einfluss einer verstärkten P8-Expression. Es wäre denkbar, dass eine Überexpression von P8 in nativen Betazellen einen stärkeren kumulativen Anstieg des Insulingehaltes bewirkt. Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen eine Aktivierung des Insulinpromotors durch das Protein P8 jedoch nicht nachweisen ließ, könnte man diese Tendenz des erhöhten netto-Insulingehaltes der Zellen auf eine gesteigerte P8 induzierte Zellproliferation zurückführen. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte P8 eine Induktion der Betazellproliferation bewirken. Hierbei ist es wichtig hervorzuheben, dass die Zellen bei der Expansion nicht entdifferenzieren, was anhand der unveränderten betazellspezifischen Differenzierungsmarker, wie auch der beibehaltenen Betazellfunktion gezeigt werden konnte.



## 6 Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist die häufigste endokrine Störung des Glukosestoffwechsels und betrifft einen großen Teil der Bevölkerung. Der progressive Verlauf der Erkrankung führt zu schweren Sekundärschäden und schränkt die Lebensqualität der Betroffenen deutlich ein. Als einzige kausale Therapiemöglichkeiten stehen bislang nur die Pankreas- und Inseltransplantation zur Verfügung. Der Mangel an Spenderorganen und die erforderliche lebenslange Immunsuppression schränken die weite Verfügbarkeit dieser Behandlung für die überwiegende Anzahl der Diabetiker stark ein. Daher ist es sehr wichtig, neue Therapiestrategien des Diabetes mellitus zu entwickeln. Hierbei ist die Weiterentwicklung der Zelltherapie von zentraler Bedeutung, um durch Differenzierung und Expansion insulinproduzierender Zellen den Mangel an Zellen zur Transplantation zu überwinden. In dieser Arbeit wurde eine Analyse der Expression des proliferationsassoziierten Proteins P8 in Betazellen des endokrinen Pankreas durchgeführt. Es konnte eine spezifische Genexpression von P8 in Betazellen und duktalem Vorläuferzellen des endokrinen Pankreas nachgewiesen werden. Durch die Etablierung eines spezifischen Antiserums wurde P8 im Zellkern der Betazellen lokalisiert. Expressionsanalysen zeigten im Folgenden eine positive Regulation der P8-mRNA-Expression durch Glukose als bekannten Stimulus für die Insulinsekretion und Betazellreplikation. Gleiches wurde für das Inkretinhormon GLP-1, das die Genexpression von bedeutsamen Transkriptionsfaktoren für die Betazellproliferation und -differenzierung induziert, in Betazellen als auch deren Vorläuferzellen nachgewiesen. Anhand von Transfektionsexperimenten und Funktionsuntersuchungen mittels ELISA konnte eine Dedifferenzierung der Betazellen durch eine Überexpression des potentiell proliferationsinduzierenden Proteins P8 ausgeschlossen werden. Hierbei wurden betazellspezifische Differenzierungsmarker, PDX-1 und Proinsulin, sowie die Fähigkeit der Betazellen, Insulin zu produzieren, während einer Überexpression von P8 analysiert. Zusammenfassend wurde ein proliferationsassoziiertes Protein, das als möglicher Transkriptionsfaktor in Betazellen des endokrinen Pankreas fungieren könnte, näher charakterisiert, um damit neue Aspekte zur Expansion von Betazellen unter Erhalt ihrer Funktion im Rahmen der Zelltherapie beizutragen.

## 7 Ausblick

Um eine detailliertere Vorstellung bezüglich der Funktion von P8 zu erhalten, bedarf es einer weiteren Charakterisierung des Proteins. Mit Hilfe des in dieser Arbeit erstellten Antiserums für P8 wäre es möglich, diese auf Proteinebene fortzuführen, sowie ergänzend mögliche Interaktionspartner des Proteins und dessen Zielgene zu identifizieren. Eine hierfür etablierte Methode stellt das „Yeast Two Hybrid“ nach Fields et al. dar [103]. Da die Funktion von P8 als proliferationsassoziiertes Protein bisher nur in einer Arbeit postuliert wurde [74], müsste man den Einfluss einer P8-Überexpression auf eine mögliche Zellproliferation in Betazellen als auch in duktalem Vorläuferzellen über einen längeren Zeitraum studieren. Ein allgemeines Problem bei induzierter Zellexpansion stellt unter anderem auch die Tumorbildung dar. In den Arbeiten von Su et al. wurde das Protein P8 als tumorassoziiertes Faktor beschrieben, da sie dessen Expression im Zellkern und Zytoplasma pankreatischer Karzinomzellen identifizierten und eine inverse Korrelation zwischen Apoptose und der Expression von P8 fanden [83], [84]. Unter Berücksichtigung der möglicherweise unkontrollierten mitogenen Aktivität von P8 wären somit weiterführende in vivo Untersuchungen von großem Interesse. Aufgrund der Expression von P8 in verschiedenen Organsystemen, ließe sich eine alleinige Wirkung des Proteins auf die Betazellen des endokrinen Pankreas mittels einer konditionellen transgenen Maus mit promotorkontrollierter (z. B. Insulinpromotor) Überexpression von P8 induzieren. Dieses Modell wäre gleichzeitig dafür geeignet, eine mögliche Tumorgenität zu charakterisieren. Falls sich die induzierbare Zellproliferation durch eine Überexpression beweisen ließe, wäre es möglich, diesen Effekt für therapeutische Zwecke einzusetzen. Da sich die Expansion differenzierter Zellen aufgrund der geringeren Proliferationsaktivität und möglichen Dedifferenzierung meist schwierig darstellt, erscheint die Generierung transplantierfähiger Zellen durch in vitro Differenzierung von insulinproduzierenden Zellen aus adulten Stammzellen des Pankreas ein denkbar effektives Modell. Zulewski et al. identifizierten derartige adulte Nestin-positive Stammzellen in den Pankreasinseln [86]. Aufgrund der geringen Anzahl wäre auch hier die Expansion der Zellen durch Induktion von Zellproliferation notwendig, um sie therapeutisch einsetzen zu können. Eine mögliche Therapiestrategie bestünde darin, Langerhansinseln des Menschen zu

isolieren, die Zellen zu dispergieren und adulte Nestin-positive Stammzellen zu identifizieren. Unter spezifischen Zellkulturbedingungen wäre es möglich, das Zellwachstum durch Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel P8 zu induzieren. Eine stammzellspezifische Proliferationsinduktion wäre durch Kopplung von P8 an den Nestinpromotor möglich. Nach erfolgter in vitro Expansion und anschließender Transplantation differenzierten diese zu insulinproduzierenden Betazellen, wodurch eine mögliche alternative Strategie zur kausalen Therapie des Diabetes mellitus gegeben wäre.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Nussey S, Whitehead SA. The endocrine pancreas. *Endocrinology: An Integrated Approach*, 2001. Oxford, UK: BIOS Scientific Publisher.
2. Alejandro R, Mintz DH, Noel J, Latif Z, Koh N, Russel E, Miller J. Islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc*, 1987. 19: 2359.
3. Shapiro J, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-free Immunosuppressive Regimen. *New England Journal of Medicine*, 2000. 343: 230-238.
4. Falqui L, Martinenghi S, Severini GM, Corbella P, Taglietti MV, Arcelloni C, Sarugeri E, Monti LD, Paroni R, Dozio N, Pozza G, Bordignon C. Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Human Gene Therapy*, 1999. 10: 1753-1762.
5. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC. Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. Changes in beta cell replication and mass. *J Clin Invest*, 1994. 93: 1577-1582.
6. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC. Transplanted beta-cell replication and mass after 95 % pancreatectomy. *Transplant Proc*, 1994. 26: 657.
7. Beattie G, Itkin-Ansari P, Cirulli V, Leibowitz G, Lopez AD, Bossie S, Mally MI, Levine F, Hayek A. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. *Diabetes*, 1999. 48: 1013-1019.
8. Beattie G, Rubin JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A. Regulation of Proliferation and Differentiation of Human Fetal Pancreatic Islet Cells by Extracellular Matrix, Hepatocyte Growth Factor, and Cell-Cell Contact. *Diabetes*, 1996. 45: 1223-1228.
9. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schupp GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*, 1993. 42: 1715-1720.
10. Wang R, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*, 1995. 38: 1405-1411.
11. Heimberg H, Bouwens L, Heremans Y, Van De Casteele M, Lefebvre V, Pipeleers D. Adult human pancreatic duct and islet cells exhibit similarities in expression and

- differences in phosphorylation and complex formation of the homeodomain protein Ipf-1. *Diabetes*, 2000. 49: 571-579.
12. Rosenberg L, Rafaeloff R, Clas D, Kakugawa Y, Pittenger G, Vinik AI, Duguid WP. Induction of islet cell differentiation and new islet formation in the hamster - further support for a ductular origin. *Pancreas*, 1996. 13: 38-46.
13. Miralles F, Serup P, Cluzeaud F, Vandewalle A, Czernichow P, Scharfmann R. Characterization of beta cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Dev Dyn*, 1999. 214: 116-126.
14. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature Medicine*, 2000. 6: 278-282.
15. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. 97: 7999-8004.
16. Unno M, Nata K, Noguchi N, Narushima Y, Akiyama T, Ikeda T, Nakagawa K, Takasawa S, Okamoto H. Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice. *Diabetes*, 2002. 51 (Suppl. 3): 478-483.
17. Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest*, 1997. 99: 2001-2009.
18. Adams GA, Maestri M, Squiers EC, Alfrey EJ, Starzl TE, Dafoe DC. Augmenter of liver regeneration enhances the success rate of fetal pancreas transplantation in rodents. *Transplantation*, 1998. 65: 32-36.
19. Stoffers D, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*, 2000. 49: 741-748.
20. Hui H, Wright C, Perfetti R. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*, 2001. 50: 785-796.

21. Otonkoski TB, Beattie GM, Rubin JS, Lopez AD, Baird A, Hayek A. Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. *Diabetes*, 1994. 43: 947-953.
22. Hayek A, Beattie GM, Cirulli V, Lopez AD, Ricordi C, Rubin JS. Growth Factor / Matrix- Induced Proliferation of Human Adult  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, 1995. 44: 1458-1460.
23. Beattie GM, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A. Ex vivo expansion of human pancreatic endocrine cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82: 1852-1856.
24. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-Secreting Cells Derived From Embryonic Stem Cells Normalize Glycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes*, 2000. 49: 157-162.
25. Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 2002. 45: 309-326.
26. Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Current Biology*, 1997. 7: 689-692.
27. Qiu Y, Sharma A, Stein R. p300 Mediates Transcriptional Stimulation by the Basic Helix-Loop-Helix Activators of the Insulin Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. 18: 2957-2964.
28. Jones P, Persaud SJ. Protein Kinases, Protein Phosphorylation, and the Regulation of Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrine Reviews*, 1998. 19: 429-461.
29. Kinnon M, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*, 2001. 44: 1203-1214.
30. Docherty K, Clark AR. Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J*, 1994. 8: 20-27.
31. German M. Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glukokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90: 1781-1785.
32. Petersen H, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, Serup P. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett*, 1998. 431: 362-366.

33. Mac Farlane S, Shepherd RM., Cosgrove KE, James RF, Dunne MJ, Docherty K. Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Diabetes*, 2000. 49: 418-423.
34. Shushan E, Cerasi E, Melloul D. Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of the human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol*, 1999. 18: 471-479.
35. Marshak S, Totary H, Cerasi E, Melloul D. Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996. 93: 15057-62.
36. Stoffers D, Thomas MK, Habener JF. Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Endocrinol Metab*, 1997. 8: 145-151.
37. Habener J, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998. 110: 12-21.
38. Madsen O, Jensen J, Petersen HV, Pedersen EE, Oster A, Andersen FG, Jorgensen MC, Jensen PB, Larsson LI, Serup P. Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype. *Hormon Met Res*, 1997. 29: 265-270.
39. Ohlson H, Karlsson K, Edlund T. IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J*, 1993. 12: 4251-4259.
40. Waeber H, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT 2 gene by the IPF-1/STF-1/ IDX-1 homeobox factor. *Molecular Endocrinology*, 1996. 10: 1327-1334.
41. Watada M, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y. An essential role of insulin promotor factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes*, 1996. 45: 1478-1488.
42. Watada M, Kajimoto Y, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J, Yamasaki Y. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet-amyloid gene transcription. *BiochemBiophys Res Commun*, 1996. 229: 746-751.
43. Carty M, Lillquist JS, Peshavaria M, Stein R, Soeller WC. Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptid / amylin gene expression in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272: 11986-11993.

44. Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR. Characterization of somatostatin transactivating factor 1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Molecular Endocrinology*, 1993. 7: 1145-1156.
45. Mac Farlane W, Read ML, Gilligan M, Bujalska I, Docherty K. Glucose modulates the binding activity of the  $\beta$ -cell transcription factor IUF-1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem J*, 1994. 303: 625-631.
46. Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS. The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein-interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Molecular Cell Biology*, 2000. 20: 900-911.
47. Glick E, Leshkowitz D, Walker MD. Transcription factor BETA 2 acts cooperatively with E2A and PDX-1 to activate the insulin gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275: 2199-2204.
48. Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy MR. Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Molecular Endocrinology*, 1994. 8: 1798-1806.
49. Itkin-Ansari P, Bain G, Beattie GM, Murre C, Hayek A, Levine F. E2A gene products are not required for insulin gene expression. *Endocrinology*, 1996. 137: 3540-3543.
50. Sharma A, Moore M, Marcora E, Lee JE, Qiu Y, Samaras S, Stein R. The Neuro D1/Beta 2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300 / CREB binding protein binding. *Molecular Cell Biology*, 1999. 19: 704-713.
51. German M, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo-domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev*, 1992. 6: 2165-2176.
52. Habener J. Glucagon like peptide-1 agonist stimulation of Beta cell growth and development. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 2001. 8: 74-81.
53. Perfetti RZ, Zouh J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine



- cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 2000. 141: 4600-4605.
54. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1) - cells. *Diabetologia*, 1999. 42: 856-864.
55. Kieffer T, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 1999. 20: 867-913.
56. Drucker D. Glucagon-like peptides. *Diabetes*, 1998. 47: 159-169.
57. Drucker D, Philippe J, Mosjov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987. 84: 3434-3438.
58. Habener J. The incretin notion and its relevance to diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1993. 22: 775-794.
59. Fehmann H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide - I (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*, 1992. 130: 159-166.
60. Holz G, Kuhlreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature*, 1993. 361: 362-365.
61. Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*, 1999. 140: 4904-4907.
62. Hussain M, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. 274: 616-619.
63. Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. 96: 674-679.
64. Bonner-Weir S. Islet growth and development in the adult. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000. 24: 297-302.
65. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes*, 1998. 47: 1817-1823.

66. Edlund H. Pancreas: How to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11: 663-668.
67. Stoffers D, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF-1-gene coding sequence. *Nat Genet*, 1997. 15: 138-139.
68. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf-1/PDX-1*-gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes and Dev*, 1998. 12: 1763-1768.
69. Stoffers D, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY-4) linked to IPF-1. *Nat Genet*, 1997. 17: 138-139.
70. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes*, 1999. 48: 507-513.
71. Dutta S, Gannon M, Peers B, Wright C, Bonner-Weir S, Montminy M. PDX:PBX-complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. 98: 1065-1070.
72. Kritzik M, Jones E, Chen Z, Krakowski M, Krahl T, Good A, Wright C, Fox H, Sarvetnick N. PDX-1 and *Msx-2* expression in the regenerating and developing pancreas. *J. Endocrinology*, 1999. 163: 523-530.
73. Xu GS, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both,  $\beta$ -cell replication and neogenesis, resulting in increased  $\beta$ -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 1999. 48: 2270-2276.
74. Mallo G, Fiedler F, Calvo EL, Vasseur E, Keim V, Morisset J, Iovanna JL. Cloning and Expression of the Rat p8 cDNA, a New Gene Activated in Pancreas during Acute Phase of Pancreatitis, Pancreatic Development, and Regeneration, and Which Promotes Cellular Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272: 32360-32369.
75. Vasseur S, Mallo GV, Fiedler F, Bödeker H, Cánepa E, Moreno S, Iovanna JL. Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *European Journal of Biochemistry*, 1999. 259: 670-675.
76. Vasseur S, Mallo GV, Garcia-Montero A, Ortiz EM, Fiedler F, Cánepa E, Moreno S, Iovanna JL. Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: Promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) and

- C/EBP  $\beta$  trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter. *Biochemical Journal*, 1999. 343: 377-383.
77. Encinar J, Mallo GV, Mizyrycki C, Giono L, Gonzáles-Ros JM, Rico M, Cánepa E, Moreno S, Neira JL, Iovanna JL. Human p8 Is a HMG-I/Y-like Protein with DNA Binding Activity Enhanced by Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276: 2742-2751.
78. Bustin M, Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acids Research Mol Biol*, 1996. 54: 35-100.
79. Lekstrom-Himes J, Xanthopolous KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 1998. 273: 28545-28548.
80. Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, 1998. 273: 29279-29282.
81. Pin C, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF. The bHLH transcription factor Mist 1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *Journal of Cell Biology*, 2001. 155: 519-530.
82. Jiang Y, Vaccaro MI, Fiedler F, Calvo EL, Iovanna JL. Lipopolysaccharides Induce p8 mRNA Expression in Vivo and in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. 260: 686-690.
83. Su S, Motoo Y, Iovanna JL, Xie MJ, Mouri K, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Watanabe H, Okai T, Matsubara F, Sawabu N. Expression of p8 in Human Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2001. 7: 309-313.
84. Su S, Motoo Y, Iovanna JL, Berthézène P, Xie MJ, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. Overexpression of p8 Is Inverseley Correlated with Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2001. 7: 1320-1324.
85. Motoo Y, Iovanna JL, Mallo GV, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. P8 Expression Is Induced in Acinar Cells During Chronic Pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 2001. 46: 1640-1646.
86. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, 2001. 50: 521-33.

87. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 1992. 130: 167-78.
88. Lacy PE and M. Kostianovsky. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 1967. 16: 35-9.
89. Van De Winkel M and Pipeleers D. Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. 114: 835-42.
90. Wollheim CB, Meda P and Halban PA. Establishment and culture of insulin-secreting beta cell lines. *Methods Enzymol*, 1990. 192: 223-35.
91. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes*, 1989. 38: 49-53.
92. Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*, 2000. 141: 1926-9.
93. Rosewicz S, Vogt D, Harth N, Grund C, Franke WW, Ruppert S, Schweitzer E, Riecken EO, Wiedenmann B. An amphicrine pancreatic cell line: AR42J cells combine exocrine and neuroendocrine properties. *Eur J Cell Biol*, 1992. 59: 80-91.
94. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest*, 1996. 97: 1647-54.
95. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes*, 1999. 48: 2358-66.
96. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 1996. 122: 983-95.
97. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 1994. 371: 606-9.

98. Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF. Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J Clin Invest*, 1998. 102: 232-41.
99. Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF, Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1999. 104: R41-8.
100. Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D. A pancreatic beta-cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta ), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem*, 2001. 276: 17533-40.
101. Sharma , Jhala US, Johnson T, Ferreri K, Leonard J, Montminy M. Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol*, 1997. 17: 2598-604.
102. Poitout V, Olson LK, Robertson RP. Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab*, 1996. 22: 7-14.
103. Fields S and Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989. 340: 245-6.

## **Danksagungen**

Ich danke

Herrn Priv.-Doz. Dr. Jochen Seufert und Prof. Dr. Franz Jakob, die diese Arbeit bereitstellten und durch neue Ideen, Diskussionen und Lösungsvorschläge das Fortschreiten der Arbeit förderten.

Sandra Nixdorf und Jeanette Roller, die mich in der geistigen und praktischen Arbeit sehr unterstützten und mit denen das „Leben an der Bench“ einfach schöner war.

Allen MTA's aus dem Routinelabor der Endokrinologie, die für ein gute Stimmung sorgten und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Mitdoktoranden Martin, Katharina, Barbara, Dorothee, Peter und Maria, die meine Zellkulturen an einigen Tagen vor dem Verhungern retteten, wenn ich mal nicht zur Stelle sein konnte.

Ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester, die mir das Studium und damit auch diese Dissertation ermöglichten und mich immer mit ihren positiven Gedanken stärkten.

Und meinem Freund Stefan, der mir die nötige Energie gab und es auf zauberhafte Weise immer wieder schaffte, mich auch in schlechten Zeiten zu ermuntern und zum Lächeln zu bringen.

# Curriculum Vitae

## Personalien

Name	Anita Knoll
geboren	13.02.1976 in Fürth, Deutschland
Familienstand	ledig
Adresse	Gerbrunner Weg 10, D - 97074 Würzburg

## Schulbildung

1982 - 1985	Grundschule Fürth
1985 - 1986	Grundschule Brilon
1986 - 1995	Gymnasium Petrinum, Brilon
13.06.1995	Abschluss: Abitur

## Hochschulausbildung

14.09.1995 – 30.09.1998	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
1.10.1998 – 31.03.2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität Würzburg
18.09.1997	Physikum
27.08.1998	1. Staatsexamen
04.09.2001	2. Staatsexamen
05.11.2002	3. Staatsexamen

## Praktische Erfahrungen

18.02.1998 – 11.03.1998	Famulatur, Anaesthesiologie, Medizinische Universität zu Lübeck
02.08.1999 – 30.08.1999	Famulatur, Innere Medizin, Juliusspital, Würzburg
30.09.1999 – 29.10.1999	Famulatur, Innere Medizin, Universitätsklinik „Hospital Clinic“, Barcelona, Spanien
29.03.2000 – 30.04.2000	Famulatur, allgemeinmedizinische Praxis, Würzburg
01.08.2000 – 18.09.2000	Famulatur, klinische Medizin, Hämatologie, Laboratoriumsmedizin, Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg
22.10.2001 – 06.02.002	Praktisches Jahr: 1. Terial, Chirurgie, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador
11.02.2002 - 02.06.2002	2. Terial, Anaesthesiologie, Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg
03.06.2002 – 22.09.2002	3. Terial, Innere Medizin, Medizinische Universitätsklinik Würzburg

## Berufliche Erfahrungen

01.01.2003 – 30.06.2004	Ärztin im Praktikum Medizinische Universitätsklinik Würzburg, Innere Medizin
seit 01.07.2004	Assistenzärztin Medizinische Universitätsklinik Würzburg, Innere Medizin