

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

**Kontrollierte Expansion von Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen
Pankreas durch das Protein p8**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Martin Ludwig Gehlen
aus
Bad Driburg**

Würzburg, Juni 2004

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

Koreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 9.02.2005

Der Promovend ist Arzt

Meiner Großmutter

Dr. med. Elisabeth Többen

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Neue Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus	1
1.2. p8, ein Proliferation assoziiertes Protein	3
1.3. p8 und β -Zellen des endokrinen Pankreas	7
1.4. Hypothese	7
1.5. Zielsetzung der Arbeit	9
2. Materialien	10
2.1. Chemikalien und Reagenzien	10
2.2. Plasmide	11
2.2.1 Kommerziell bezogene Plasmide	
2.2.2. Neu klonierte Plasmide	
2.3. Enzyme und Puffer	15
2.4. Primer-Oligonukleotide	15
2.5. Zelllinien	16
2.6. Zellkulturmedien	16
2.7. Reaktions-Kits	17
2.8. Bakterienstämme	17
2.9. Bakterienmedien	17
2.10. Pufferlösungen	18
2.10.1. Western-Blot	
2.10.2. Immunodetektion	
2.10.3. Andere Puffer	
2.11. Antiseren	18
2.12. Elektrophorese von DNA und Proteinen	19
2.13. Geräteliste und Verbrauchsgegenstände	19
3. Methoden	21
3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.2. TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese	22
3.3. Konzentrationsmessungen mit Photometer	22
3.4. Enzymatische Reaktionen	22
3.4.1. DNA-Restriktion mit Enzymen	
3.4.2. Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Polymerase	
3.4.3. Dephosphorylieren mit alkalischer-Phosphatase	
3.5. Methoden zum Klonieren eines Plasmids	24
3.5.1. Restriktion von Insert und Plasmid mit Enzymen	
3.5.2. Extraktion von DNA aus einem Gel	
3.5.3. Ligation von Insert und Plasmid	
3.5.4. Plasmidamplifikation in E.coli	
3.5.5. DNA-Sequenzierung	

3.5.6. DNA-Präparation (Maxi)	
3.6. Klonieren des Plasmids p8pEGFP-c1MG	28
3.6.1. Modifizieren des Plasmids pEGFP-c1 zu pEGFP-c1MG	
3.6.2. Subklonieren von p8-cDNA in pEGFP-c1MG als EcoRI-Fragment	
3.7. Klonieren des Plasmids p8pEGFP-c1MG-NLS-	33
3.8. Klonieren des Plasmids p8-pOPRSV1	34
3.9. Zellkultur	35
3.9.1. Transfektion von Zellen mit Lipofectamine®	
3.9.2. Fluoreszenzmikroskopie	
3.9.3. Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer	
3.10. Etablierung von INS-1-Zellen mit stabiler p8-Überexpression	37
3.10.1. Stabile Transfektionen von INS-1-Zellen	
3.10.2. Prinzip des Lac-Switch-Systems®	
3.11. Western-Blot	40
3.11.1. Whole-Cell-Extract	
3.11.2. Polyacrylamid (PAA)-Gel-Elektrophorese (PAGE)	
3.11.3. Fixieren der Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran	
3.11.4. Immunodetektion	
3.12. Semiquantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)	42
3.12.1. RNA-Extraktion mit Trizol®	
3.12.2. DNase1-Verdau	
3.12.3. Reverse-Transkription	
3.12.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
3.12.5. 1.2% TAE-Agarose-Gel und Auswertung	
3.13. Statistik	44
3.13.1. Median-Test mit Vierfelder-Chi-Quadrat-Test und Fischer-Yeats-Test	
3.13.2. U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon)	
3.13.3. Nichtparametrischer ANOVA und Dunnett's-Test	
4. Ergebnisse	48
4.1. Subzelluläre Lokalisation des Proteins p8	48
4.2. Identifizieren eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im Protein p8	48
4.3. Spezifische Expression der transfizierten p8-GFP-Fusionsproteine	52
4.4. Etablieren stabiler INS-1-Zellen mit induzierbarer p8-Überexpression	55
4.5. p8-abhängige Zellproliferation	57
5. Diskussion und Ausblick	64
5.1. Subzelluläre Lokalisation des Proteins p8	64
5.2. Einfluss des Proteins p8 auf das Zellwachstum von β-Zellen des endokrinen Pankreas	60
5.2.1. stabile INS-1-Zellen mit induzierbarer p8-Überexpression	

5.2.2. Zellzählungsexperimente	
5.2.3. Insulin-Sekretion der stabilen INS-1-Zellen	
5.3. Funktion und potentielle therapeutische Nutzung des Proteins p8	67
5.4. Ausblick	69
6. Zusammenfassung	70
7. Literatur	71

1. Einleitung

1.1. Neue Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen. Man schätzt, dass ca. 5 % der Bevölkerung in Deutschland an dieser Krankheit leiden. Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für eine ätiologisch heterogene Gruppe von Krankheiten des Kohlenhydratstoffwechsels, deren gemeinsames Charakteristikum der chronisch erhöhte Blutzucker ist. Pathophysiologisch liegen abhängig vom Typ des Diabetes eine mangelnde Insulinsekretion und / oder eine Insulinresistenz vor (48). Die medikamentösen Therapiemöglichkeiten sind in den letzten Jahren immer mehr verbessert worden. Allen bisherigen Therapien ist aber gemeinsam, dass sie nur symptomatisch die Krankheit behandeln und eine Reihe von gravierenden Nachteilen aufweisen. Komplizierte Therapieschemata mit Injektionen von Insulin verlangen von den Patienten ein hohes Maß an Wissen und Compliance. Bei einigen Therapieformen sind Stoffwechselentgleisungen, wie beispielsweise eine akute Hypoglykämie zu befürchten. Chronische Komplikationen wie die diabetische Makro- und Mikroangiopathie und Neuropathien beeinflussen maßgeblich die Lebensqualität und Lebensdauer der Diabetiker (48). Daher ist es von höchstem Interesse, neue Therapieformen zu etablieren.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Zelltherapie des Diabetes mellitus Typ-1 als eine interessante Alternative dar. Unter Zelltherapie versteht man den Ersatz von zerstörten β -Zellen durch Transplantation eines Pankreas oder Langerhans'scher Inseln.

Pankreas-Transplantationen zur Behandlung des Typ-1-Diabetes werden seit Jahren erfolgreich durchgeführt. Man unterscheidet verschiedene Formen der Pankreastransplantation: die simultane Pankreas- und Nierentransplantation (SPK), die Pankreastransplantation nach Nierentransplantation (PAK) und die isolierte Pankreastransplantation. Je nach Form des durchgeführten Eingriffs sind 1 Jahr nach dem operativen Eingriff 60-80 % der Transplantierten insulinunabhängig. 10 Jahre nach simultaner Pankreas- Nierentransplantation finden sich im Vergleich zu

Patienten mit isolierter Nierentransplantation mit Insulintherapie deutlich weniger Neuropathien, eine erhöhte Lebensqualität, eine erhöhte Lebenserwartung, eine bessere Nierenfunktion sowie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko.

Die Pankreastransplantation stellt einen großen operativen Eingriff dar und erfordert eine lebenslange Immunsuppression. Diese Therapieform wird eingesetzt bei Patienten, die bereits erhebliche Sekundärkomplikationen (z.B. Niereninsuffizienz) haben (11, 13, 31, 43).

Für die Inseltransplantation werden Pankreasinseln isoliert und nach CT-gesteuerter Punktion in die Portalvene injiziert. Wie bei der Pankreastransplantation ist auch hier eine lebenslange Immunsuppression nötig. Daher werden die Inselzellen meist ebenfalls zusammen mit einer Niere transplantiert. In allen bisherigen Studien fand sich nur eine geringe Effizienz dieser Methode. Nur etwa 6 bis 10 % der Transplantierten waren nach einem Jahr insulinunabhängig. Als Ursache hierfür werden diabetogene Effekte der Immunsuppressiva, eine Schädigung der Zellen beim Aufreinigen, Abstoßungsreaktionen und ein mangelndes Engraftment diskutiert (10, 13, 19, 31, 43, 51).

In einem neuen Therapieansatz wurden durch Optimierung der Transplantation erheblich bessere Ergebnisse erzielt (Edmonton-Protokoll). Empfänger der Inselzellen waren Typ-1-Diabetiker mit hochgradig instabilem Blutzucker. Es wurde eine weniger β -Zell-toxische, glukokortikoid-freie Immunsuppression gewählt. Die Zellen wurden in einem Kulturmedium ohne Fremdproteine kultiviert. Von 17 transplantierten Patienten waren nach einem Jahr 80 % insulinunabhängig. Zur Zeit werden Multicenterstudien mit größerer Probandenzahl durchgeführt (27, 44, 53, 54, 55).

Neben den medizinischen Problemen steht dem Therapieerfolg und der Nutzung vor allen Dingen ein Mangel an Spenderorganen entgegen.

Im Gegensatz zu früheren Annahmen geht man heute davon aus, dass die β -Zellmenge des endokrinen Pankreas nicht gleichbleibend ist, sondern der Stoffwechsellage angepasst wird. Neogenese, Regeneration und Apoptose der β -Zellen sind Teil dieses dynamischen Prozesses (3, 6, 12). Neben der Entstehung aus duktalem (4, 5, 6, 12) und intransulärem (29, 50, 66, 68) Vorläuferzellen sind β -Zellen selbst im begrenzten Umfang in der Lage, zu proliferieren (6, 12, 38, 46).

Alle Zellen des Pankreas entwickeln sich aus demselben endodermalen Gewebe. An der Differenzierung der einzelnen Zellen in der Organogenese sind eine Vielzahl von Molekülen, z.B. Transkriptionsfaktoren, beteiligt (16, 17, 21). Kenntnisse der molekularen Regulation dieser Vorgänge können Rückschlüsse auf die Steuerung der β -Zell-Neogenese im adulten Pankreas geben. Einzelne molekulare Faktoren können möglicherweise für die Expansion von β -Zellen nutzbar gemacht werden.

Mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und spezifischen Matrices gelang es, β -Zellen in vitro zu vermehren (23). In anderen Arbeiten wurden duktale Vorläuferzellen (4, 7, 41, 46), intransuläre Vorläuferzellen (7, 50, 68) und embryonale Stammzellen (1, 5, 7, 32, 56) in vitro zu Insulin produzierenden Zellen differenziert und dann transplantiert.

Auf den Mangel an Spenderorganen als einen limitierenden Faktor für die Durchführung von Inseltransplantationen wurde bereits hingewiesen. Daher ist die Suche nach alternativen Inselzellquellen wichtig. Die geschilderten Fakten machen das Interesse an der Identifizierung und Charakterisierung molekularer Mechanismen, die das Wachstumsverhalten der β -Zellen und ihrer Vorläuferzellen beeinflussen, deutlich. Vor diesem Hintergrund wurde das Protein p8 identifiziert. p8 ist ein neu entdecktes Protein, welches mit Zellproliferation assoziiert ist.

1.2. p8, ein Proliferation assoziiertes Protein

p8 der Ratte ist ein 80 Aminosäuren langes Protein, das im Zusammenhang mit Pankreatitis 1997 erstmals beschrieben wurde. Die Arbeitsgruppe *Iovanna et al.* hatte sich zum Ziel gesetzt, Gene zu identifizieren, die während der akuten Phase einer Pankreatitis vermehrt exprimiert werden. Durch Injektion von 1%iger Natrium-Taurocholat-Lösung in den Ductus pancreaticus von Ratten wurde eine artifizielle Pankreatitis erzeugt. Aus dem Pankreas wurde die RNA extrahiert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und eine „cDNA-library“ erstellt. 288 Klone wurden sequenziert und dann untereinander und mit der Genbank verglichen.

Eine bis dato unbekannte DNA-Sequenz fand sich in drei Klonen. Die putative Aminosäuresequenz machte eine Helix-Loop-Helix-Sekundärstruktur wahrscheinlich

und zeigte Homologie zu Homeodomain-Transkriptionsfaktoren (Abb. 1.2.). Daher wurde das mutmaßliche Protein als „homeodomain-like“ bezeichnet. Am C-terminalen Ende wurde ein „nukleäres Lokalisationssignal (NLS)“ vorhergesagt. Das untersuchte Protein erhielt die Bezeichnung p8.

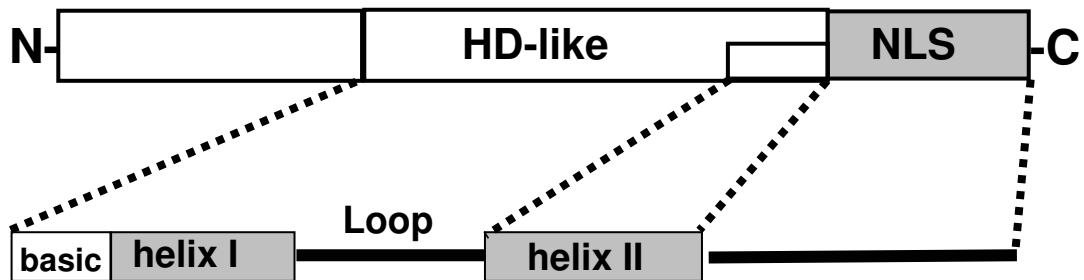


Abb.1.1.: Sekundärstruktur von p8. p8 zeigt Homologie zu Homeodomain-Transkriptionsfaktoren (HD-like/ homeodomain-like). Am C-terminalen Ende von p8 finden sich NLS-Sequenzen (nukleäres Lokalisationssignal). (Iovanna et al. 1997)

ratp8	R T 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 W R	80
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 F Q N R R M K Q K K R	70
GBX2	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 F Q N R R A K W K R V	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 F Q N R R A K 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 F Q N K R A K 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 F Q N R R M K 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 F Q N R R A K L K R D	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 F Q N R R M K 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 F Q N R R A K W K R I	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 F Q N K R A K I K K A	78

Abb. 1.2.: Aminosäuresequenz der putativen Homeodomain-box von p8. Vergleich der Aminosäuresequenz von p8 mit der Sequenz verschiedener Homeodomain-Transkriptionsfaktoren. (nach Iovanna et al. 1997)

Während der ersten 24 Stunden nach Induktion einer akuten Pankreatitis wurde p8 im Pankreas stark exprimiert (33, 36, 60, 65). Eine hohe Expression konnte ebenfalls im

embryonalen Pankreas und nach Pankreatektomie im regenerierenden Pankreas, in Speicheldrüsen, im Magen, im Kolon, in der Leber und in den Nieren nachgewiesen werden. Mit in-situ-Hybridisierung wurde p8 nur in den Azinus-Zellen des exokrinen Pankreas gefunden, nicht jedoch in den Langerhans'schen Inseln (33).

Während basal in AR42J-Zellen (Ratten-Pankreas-Tumorzellen, exokrin) p8 nur schwach exprimiert wurde, ließ sich ein deutlicher Anstieg der p8-Expression durch Inkubation dieser Zellen mit Zellstress-auslösenden Stoffen wie Dexamethason, Cycloheximid, TNF α und Staurosporin nachweisen.

Ein p8-cDNA-Vektorkonstrukt wurde in Cos-7- und AR42J-Zellen transfiziert, Zellzählungen wurden durchgeführt. Nach 6 Tagen war die Zellzahl der p8-überexprimierenden Cos-7-Zellen um 100 %, die der p8-überexprimierenden AR42J-Zellen um 50 % höher als die der nicht p8-überexprimierenden Kontrollzellen (33).

p8-cDNA der Ratte (rp8-cDNA) weist 91 % Homologie zu p8-cDNA der Maus (mp8-cDNA) und 75 % Homologie zu p8-cDNA des Menschen (hump8-cDNA) auf. rp8 und mp8 bestehen aus 80 Aminosäuren (63, 64). Die für hump8 (82 Aminosäuren) kodierende DNA-Sequenz ist auf Chromosom 16 lokalisiert und enthält drei Exons, die von zwei Introns unterbrochen werden. Wie Cos-7- und Ar42J-Zellen proliferierten auch HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zellen), die stabil hump8 überexprimieren (64). Dieses deutet darauf hin, dass p8-Überexpression Zellproliferation induziert.

In NIH-3T3-Zellen (Maus-Fibroblasten) wurden mittels Reporterassays Promotoranalysen des mp8-Promotors durchgeführt. Ein zwischen den Nukleotiden -111 und -101 gelegenes putatives C/EBP-*cis*-acting-Element scheint für die Aktivierung des mp8-Promotors eine wichtige Rolle zu spielen. Vermutlich beeinflussen C/EBP- α und - β den mp8-Promotor direkt und indirekt (63). Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien führten in vivo (Pankreas, Leber und Niere) und in vitro (AR42J-Zellen) zu einer vermehrten p8-Expression (26).

p8-Überexpression wurde sowohl in Pankreas- (58, 59) als auch in Mammakarzinomen (9, 42) gefunden. Für Pankreaskarzinome wird ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Malignität (verminderter Differenzierungsgrad, Auftreten von Lymphknotenmetastasen) und der Höhe der p8-Expression postuliert (58, 59). Für Mammakarzinome konnte ein solcher

Zusammenhang nicht gezeigt werden. Zwar war die p8-mRNA-Expression signifikant höher als in normalem Mammagewebe, einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ging jedoch eine kurzzeitige Induktion der p8-mRNA-Synthese voraus. *Ree et al.* folgerten daraus, p8 sei ein Mediator sowohl für Stimulation als auch für Inhibition des Zellwachstums (9, 42).

Derzeit ist über Struktur, Wirkungsweise und molekulare Interaktionspartner von p8 wenig bekannt. Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass p8 in wässriger Lösung zum Großteil ungefaltet vorliegt (kaum ausgeprägte Sekundärstruktur) und keine stärkeren DNA-Bindungstendenzen aufweist (18). Nach Phosphorylierung wurden sowohl eine starke DNA-Bindung als auch ein hoher Anteil an Sekundärstruktur vorgefunden. Trotz geringer Homologie von nur ca. 35 % bezeichnen *Jovanna et al.* p8 als HMG-I/Y-ähnliches Protein (high mobility group proteins). Dieses wird mit dem isoelektrischen Punkte, dem Anteil bestimmter Aminosäuresequenzen, Hitzestabilität bei 100° C und der Tatsache, dass p8 nicht durch 2 %ige Trichloressigsäure gefällt werden kann, begründet (18).

Es konnte also gezeigt werden, dass p8 während der akuten Phase einer Pankreatitis, der embryonalen Entwicklung des Pankreas, nach subtotaler Pankreatektomie und in oben genannten Karzinomen vermehrt exprimiert wird. Alle vier Situationen sind mit starker Zellproliferation assoziiert. Überexpression von rp8 in Cos-7- und AR42J-Zellen und von hump8 in HeLa-Zellen induziert signifikante Zellproliferation. Dieses deutet darauf hin, dass p8-Überexpression Zellproliferation induziert. Vorhergesagt wurde für p8 eine Helix-Loop-Helix-Sekundär-Struktur und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). p8 ist nicht pankreasspezifisch, sondern auch in anderen Organen exprimiert. p8 wurde in bisherigen Untersuchungen nicht im endokrinen Pankreas nachgewiesen (9, 22, 25, 26, 33, 36, 42, 58-65).

1.3. p8 und β -Zellen des endokrinen Pankreas

Iovanna et al. konnten zeigen, dass p8 in AR42J-Zellen exprimiert wird und dass p8-Überexpression Zellproliferation auslöst (33). Von AR42J-Zellen ist bekannt, dass sie den Phänotyp pluripotenter Vorläuferzellen besitzen, die sowohl zu exokrinen als auch zu endokrinen Zellen des Pankreas differenzieren können. Stimulation mit Dexamethason führt zu exokriner, Stimulation mit Activin und Betacellulin zu einer endokrinen Differenzierung (34, 35, 67). Die Existenz von p8 in Zellen des endokrinen Pankreas wurde von *Seufert et al.* mittels RT-PCR in INS-1-, HIT-T15-, β -TC6-, AR42J-, Panc-1-Zellen und humanen Pankreasinseln untersucht. HIT-T15 ist eine Hamster- β -Zelllinie, β -TC6 eine Maus- β -Zelllinie. Panc-1 ist eine humane exokrine Pankreaszelllinie.

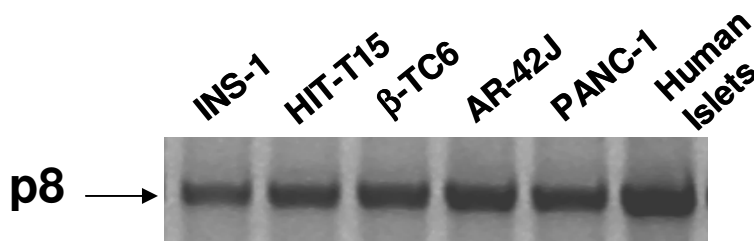


Abb.1.3.: Nachweis von p8-mRNA in Zelllinien des exokrinen und endokrinen Pankreas mittels RT-PCR: HIT-T15 ist eine Hamster- β -Zelllinie, β -TC6 eine Maus- β -Zelllinie. Panc-1 ist eine humane exokrine Pankreaszelllinie. (RT-PCR)
(Mit freundlicher Genehmigung von *Seufert et al.*)

In allen 6 Zelllinien wurde mit RT-PCR für p8 eine deutliche Bande gefunden. Dies lässt den Schluss zu, dass p8 nicht nur im exokrinen, sondern auch im endokrinen Pankreas eine Funktion hat.

1.4. Hypothese

Die dargelegten Fakten deuten darauf hin, dass p8 eine wichtige Rolle im Proliferationsverhalten von Zellen des exokrinen Pankreas und von gemeinsamen Vorläuferzellen des exokrinen und endokrinen Pankreas spielt. Entgegen vorherigen

Arbeiten (33) konnte p8-mRNA auch in Zellen des endokrinen Pankreas nachgewiesen werden. In (bislang unveröffentlichten) Arbeiten von *Seufert et al.* wurde die p8-mRNA-Expression und die Proliferation (BrdU) von INS-1-Zellen (Ratten- β -Zelllinie) in supraphysiologischer (25 mM) und physiologischer (11.1 mM) Glukosekonzentration untersucht. Die Höhe der physiologischen Konzentration bezieht sich auf das Nährmedium von INS-1-Zellen und divergiert von der für den Menschen physiologischen Glukosekonzentration.

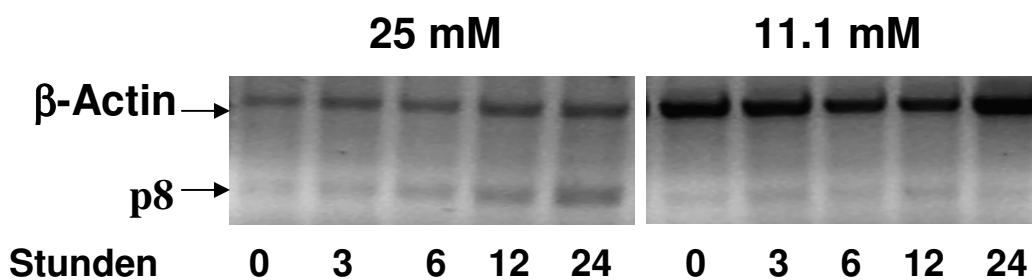


Abb. 1.4.: p8-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration: Zeitabhängige Induktion der p8-mRNA-Expression von INS-1-Zellen in physiologischer (11.1mM) und supraphysiologischer Glukoselösung (25 mM). p8 wird in erhöhter Glukoselösung deutlich stärker exprimiert. (RT-PCR)
Mit freundlicher Genehmigung von *Seufert et al.*

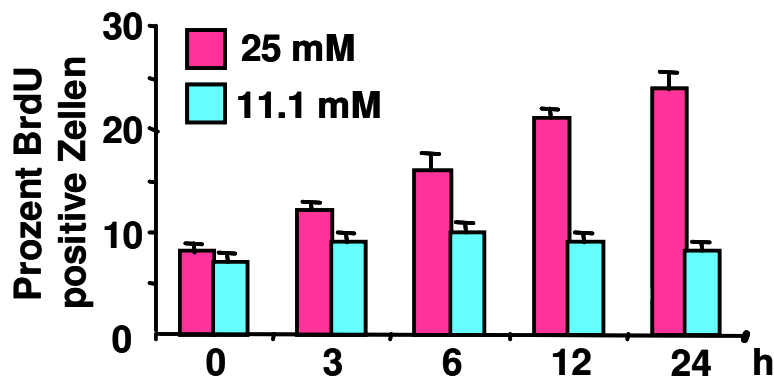


Abb. 1.5.: Zellproliferation von INS-1-Zellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration: Die Zellproliferation von INS-1-Zellen wurde in physiologischer (11.1 mM) und supraphysiologischer Glukoselösung (25 mM) ermittelt und verglichen. Die Proliferationsrate in supraphysiologischer Glukoselösung ist deutlich höher. (BrdU-Staining)
Mit freundlicher Genehmigung von *Seufert et al.*

Es wurde in supraphysiologischer Glukosekonzentration eine vermehrte p8-mRNA-Expression und eine erhöhte Zellproliferation ermittelt.

Wir stellen deshalb die These auf, dass p8 ein Mediator für Proliferation, Regeneration und Neogenese für Zellen des endokrinen Pankreas ist.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines umfassenden Forschungsprojektes, welches zum Ziel hat, Moleküle zu identifizieren, welche Zellproliferation und Differenzierung von β -Zellen des endokrinen Pankreas und deren Vorläuferzellen regulieren. p8 könnte aufgrund bisheriger Erkenntnisse ein solcher Faktor sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, Informationen über die subzelluläre Lokalisation von p8 und seine Wirkung auf die Zellproliferation im endokrinen Pankreas zu sammeln.

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Reagentien

Agarose (Roth, Karlsruhe, BRD), Ammoniumpersulfat (Aps) (Roth, Karlsruhe, BRD), Agarose (Roth, Karlsruhe, BRD), Bacto-Tryptone (DIFCO/ Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), Bacto-Yeast-Extract (DIFCO/ Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), β -Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, USA), Bromphenolblau (Sigma, St. Louis, USA), Calciumchlorid (CaCl_2) (Merck, Darmstadt, BRD), CAPS (Sigma, St. Louis, USA), Chloroform (Merck, Darmstadt, BRD), Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, USA), Dithiothreitol (DTT) (Sigma, St. Louis, USA), ECL[®] 1 und 2 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont UK), Essigsäure (Roth, Karlsruhe, BRD), Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland), Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA), G418[®] (Calbiochem, La Jolla, USA), Glukose (Sigma, St. Louis, USA), Glycerol (Sigma, St. Louis, USA), Glycin (Roth, Karlsruhe, BRD), Hygromycin (1 MU) (Calbiochem, La Jolla, USA), Immumount[®] (Shandon, Pittsburg, USA), Isopropanol (Roth, Karlsruhe, BRD), IPTG (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside) (Roth, Karlsruhe, BRD), Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, BRD), Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, BRD), Kanamycin (Sigma, St. Louis, USA), Lipofectamine[®] (Gibco, Paisley, UK), Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck, Darmstadt, BRD), Magnesiumsulfat (MgSO_4) (Merck, Darmstadt, BRD), Methanol (J.T. Baker, Deventer, Holland), Milchpulver (Töpfer, Allgäu, BRD), Natriumacetat (Roth, Karlsruhe, BRD), Natriumchlorid (NaCl) (Roth, Karlsruhe, BRD), Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, BRD), Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (Merck, Darmstadt, BRD), Natrium-Fluorid (NaF) (Sigma, St. Louis, USA), PIPES (Sigma, St. Louis, USA), Phenol-Chloroform (Roth, Karlsruhe, BRD), Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride (PMSF) (Sigma, St. Louis, USA), Polyacrylamid (PAA) (Roth, Karlsruhe, BRD), Proteinaseinhibitor (Sigma, St. Louis, USA), Salzsäure (HCl) (Merck, Darmstadt, BRD), SDS (Roth, Karlsruhe, BRD), TEMED[®] (Roth, Karlsruhe, BRD), Tris-Base (Roth, Karlsruhe,

BRD), Tris(Hydroxymethyl)aminomethan (Roth, Karlsruhe, BRD), Trizol[®] (Gibco, Paisley, UK), TSR[®] (Template-Suppression-Reagent) (PE Applied Biosystems, Foster City, USA), Tween20[®] (Merck, Darmstadt, BRD), Xylene-Cyanol (Sigma, St. Louis, USA)

2.2. Plasmide

2.2.1. Kommerziell bezogene Plasmide

- pEGFP-c1 (4.7 kb) (Clontech, Palo Alto, USA): Dieses Plasmid enthält die für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Sequenz.

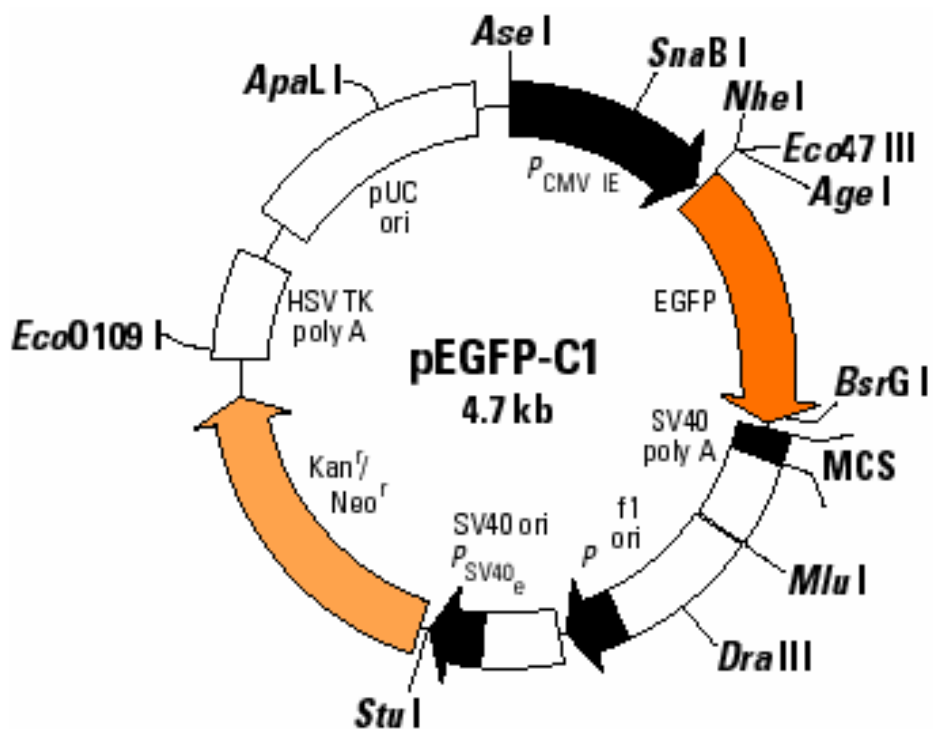


Abb. 2.1.: Plasmid pEGFP-c1. Dieses Plasmid enthält die für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Sequenz.

- pCRII-TOPO (3.9 kb) (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, BRD): In dieses Plasmid war von *Seufert et al.* die p8-cDNA kloniert worden.

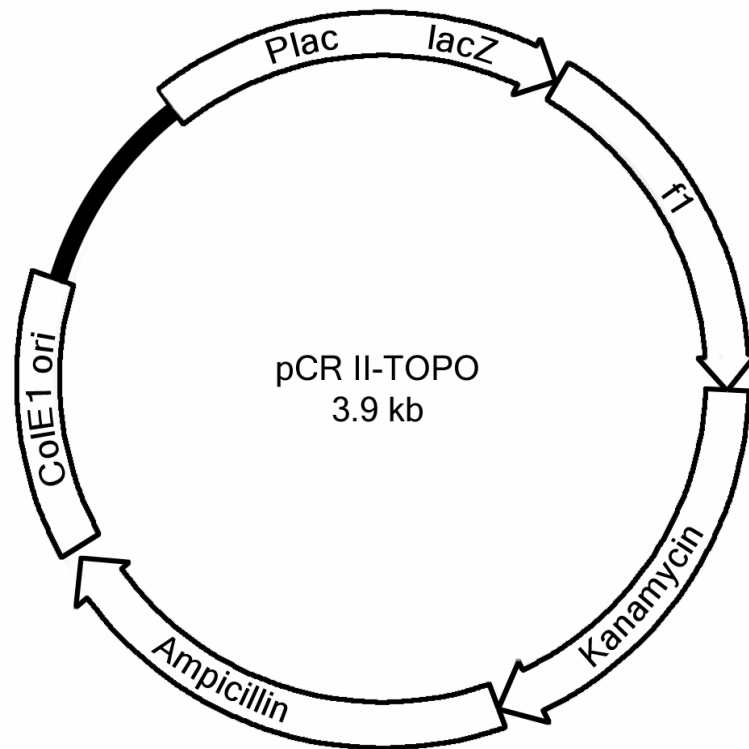


Abb. 2.2.: Plasmid pCRII-TOPO. In dieses Plasmid hatte *Seufert* die p8-cDNA kloniert.

- pOPRSV1-CAT (6.2 kB) (Stratagene, Kirkland, USA): Das Plasmid enthält den Lac-Promotor und das Lac-Operon.

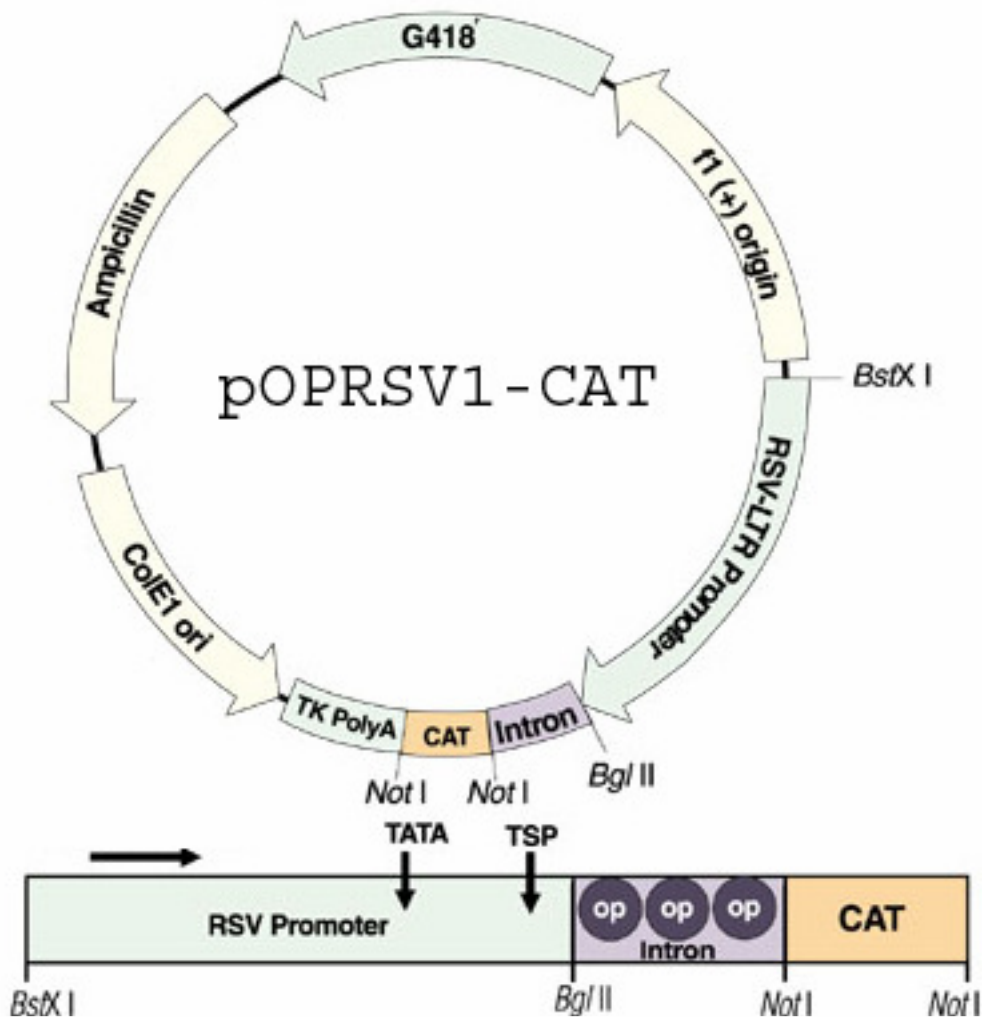


Abb. 2.3: Plasmid pOPRSV1-CAT. Das Plasmid enthält den Lac-Promotor und das Lac-Operon.

- P3'SS (6.7 kB) (Stratagene, Kirkland, USA): Dieses Plasmid kodiert für den Lac-Repressor.

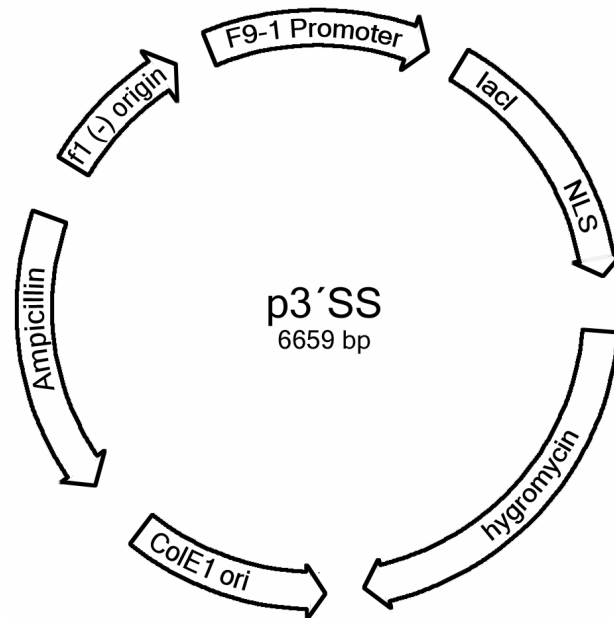


Abb.2.4.: Plasmid p3'SS. Dieses Plasmid enthielt die DNA-Sequenz für den Lac-Repressor

2.2.2. Neu klonierte Plasmide:

Es wurde p8-cDNA der Ratte verwendet. Details zur Struktur der Plasmide: *Siehe Methodenteil.*

- pEGFP-c1MG: Die Multiple-Cloning-Side (MCS) des Plasmids pEGFP-c1 wurde um einige Basenpaare verändert.
- p8pEGFP-c1MG: In die Multiple-Cloning-Side des Plasmids pEGFP-c1MG wurde p8 kloniert.
- p8pEGFP-c1MG-NLS-: Deletionskonstrukt des Plasmids P8pEGFP-c1MG. Die DNA-Sequenz des putativen nukleären Lokalisationssignals von p8 wurde deletiert.
- p8-pOPRSV1: p8 wurde in das Plasmid pOPRSV1-CAT kloniert.

2.3. Enzyme und Puffer

- DNA-Restriktion und Klonierung: EcoRI, HindIII, Klenow-Polymerase, calf-intestinal alkalische-Phosphatase (CIAP), T4-DNA-Ligase, BamHI, NaeI, SacI, jeweils kompatible Puffer, Bovines-Serum-Albumin (BSA), RNase-Inhibitor, DNase1 (Promega, Mannheim, BRD), Oligo(dt) Primer, Superscript[®]2, first-Strand-Puffer, 10 mM dNTP (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Takara, Shiga, Japan): Ex-Taq[™]-Polymerase, 10x Ex-Taq[™]-Puffer, 2.5 mM dNTP
- Sequenzierung von DNA (PE Applied Biosystems/ ABI PRISM, Forster City, USA): Big-Dye-Mix. Dieser Mix enthält Polymerase, dNTPs, fluoreszierende ddNTPs und Puffer.

2.4. Primer-Oligonukleotide

Die verwendeten Primer-Oligonukleotide wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK bezogen.

- p8EcoB:
5'-GGAATT CCCTCA TGCCCA CCAGGG CTG - 3'
- EGFP-1:
5'-CATGGT CCTGCT GGAGTT CGTG -3'
- p8-1:
5'-CCAGGT ATGATG GCCACC TTGCCA CCAAC-3'
- p8-a:
5'-GGTGTG GTGTCC GTGGTC TGGCCT CATCTCC-3'
- β -Actin-1 (act-1):
5'-TCGCGC TTCTGC GGGTGT GGTC-3'
- β -Actin-a (act-a):
5'-GGAGAA CGGCGA AAGAAA GACAAT-3'

2.5. Zelllinien

- Cos-7-Zellen: Nierentumorzellen des Affen (ATCC, Manassas, USA)
- INS-1-Zellen: Insulin produzierende Insulinom-Zelllinie der Ratte als Modell für β -Zellen des endokrinen Pankreas (erhalten von *Claes Wollheim, Abteilung Klinische Biochemie und experimentelle Diabetologie, Universität Genf, Schweiz*)
- AR42J-Zellen: Pankreas-Tumor-Zelllinie der Ratte. Diese Zellen leiten sich von einem chemisch (Azaserin) induzierten Tumor ab und wurden als Modell für pluripotente duktaale Vorläuferzellen verwendet, die sowohl zu exokrinen als auch zu endokrinen Pankreaszellen differenzieren können (ATCC, Manassas, USA)

2.6. Zellkulturmedien

Es wurden folgende Zellkulturmedien verwendet (Gibco, Invitrogen LifeTechnologies, Karlsruhe, BRD):

- Cos-7-Zellen: DMEM[®], 10% Fötale-Bovines-Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin
- INS-1-Zellen: RPMI[®] 1640 (ohne Glutamin, mit 11.1 mM Glukose), 10 % FBS, 1 % Glutamin, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1 % Natrium Pyruvat (1 mM), 1 % HEPES (10 mM), 0.1 % β -Mercaptoethanol (50 mM)
- Selektionsmedium der stabilen INS-1-Zellen: Für die Selektion der stabil transfizierten Zellen wurde 0.02 % Hygromyzin (für P3´SS) bzw. 0.18 mg/ml G418[®] (für p8-pOPRSV1) im jeweiligen Zellkulturmedium verwendet.
- Erhaltungsmedium der stabilen INS-1-Zellen: Um die stabile Integration der transfizierten Plasmide zu erhalten, wurden dem Medium der stabilen Zellen 0.01% Hygromycin und 0.09 mg/ml G418[®] beigegeben.
- AR42J-Zellen: DMEM[®], 10 % FBS, 1 % Penicillin/ Streptomycin
- TX-Medium (Transfektionsmedium): Zellmedium (s.o.) ohne Antibiotikum und ohne FBS
- Einfriermedium: Das für die Zellen geeignete Zellkulturmedium mit 10 % FBS und 5 % DMSO

2.7. Reaktions-Kits:

- Gel-Extraktion: QIAquick-Gel-Extraction-Kit[®] (Qiagen, Valencia, USA)
- Mini-DNA-Präparation: Rapid-Pure-Miniprep-Kit[®] (RPM)[™] (BIO101, Spicewood, USA), Mini-Monster-DNA-Präparation: Rapid-Pure-Mini-Monsterperp[®] (RPM 4G)[™] (BIO101, Spicewood, USA)
- Aufreinigung und Sequenzierung von DNA: Auto Seq[™] G-50[®] (PE Applied Biosystems/ ABI PRISM, Little Chalfont, UK)

2.8. Bakterienstämme

XL1 Blue[®], JM109[®] (Stratagene, Kirkland, USA)

2.9. Bakterienmedien

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone[®], 5 g/l Bacto-Yeast-Extrakt[®], 10 g/l NaCl. Nach dem Autoklavieren wurde ein Antibiotikum zugegeben (50 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin).
- LB-Medium-Platten: Zum LB-Medium (mit Antibiotikum) wurde 20 g/l Agarose gegeben und in Petrischalen gegossen.
- SOC-Medium: Dieses Medium wurde nach der Transformation als Nährmedium benutzt. 20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MgSO₄, 20 mM Glucose
- SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Yeast-Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄
- Bakterielle Glycerolstocks: Bakterien wurden als Glycerolstock bei -80° C eingefroren. Um einen Glycerolstock zu erstellen, wurden im LB-Medium befindliche Bakterien mit „Glycerol-Gefrier-Mischung“ zu je gleichen Teilen vermischt. Die „Glycerol-Gefrier-Mischung“ wurde aus 65 % Glycerol, 10 mM MgSO₄, 0.625 mM TrisCl erstellt.

2.10. Pufferlösungen

2.10.1. Western Blot

- A1-Puffer: 0.3 M TrisCl, 20 % Methanol, pH 10.4
- A2-Puffer: 25 mM TrisCl, 20 % Methanol, pH 10.4
- CAPS-Puffer: 70 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 10.5
- 4x Stacking-Gel-Puffer: 0.5 mM TrisCl, 0.1 %, SDS, pH 6.8
- 4x Separating-Gel-Puffer: 1.5 mM TrisCl, 0.4 % SDS, pH 8.8
- Tank-Puffer: 0.025 mM TrisCl, 0.192 mM Glycin, 0.1 % SDS, pH 8.3

2.10.2. Immunodetektion

- Blocking-Puffer: PBS, 5 % Milchpulver, 0.05 % Tween[®]
- Washing-Puffer: PBS, 0.05 % Tween[®]

2.10.3 Andere Puffer

- TAE (Trisacetat-EDTA): 40 mM Trisacetat, 1 mM EDTA, pH 8.3
- PBS (phosphate-buffered-saline): 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na₂ HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.4
- RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM TrisCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5 % Deoxycholate, 0.1 % SDS, 5 mM NaF, pH 7,0
- Transformations-Puffer (TB-Puffer):. 10 mM PIPES, 55 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl

2.11. Antiseren

- EGFP-Antiserum/ Rabbit polyklonal, (Clontech, Palto Alto, USA)
- Anti-Rabbit-Antiserum/ Goat polyklonal, (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Anti-Lac-Repressor-Antiserum/ Rabbit polyklonal, (Stratagene, Kirkland, USA)

2.12. Elektrophorese von DNA und Proteinen

- 100 Basenpaar-Marker (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- 1 Kilo Basenpaar-Marker (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- Protein-Marker, high: 14-200 KD (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- DNA-Loading-Puffer: 30 % Glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 % SDS, 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylene-Cyanol
- Protein-Loading-Puffer (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)

2.13. Geräteliste und Verbrauchsmaterialien

- Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA: 50 ml Reagiergefäße, Zellkulturflaschen 50 ml und 250 ml, 6well- und 12well-Zellkulturplatten, 10-cm-Zellkulturschalen
- Beckmann, Osterode, BRD: Ultrazentrifuge L7-55, Zentrifuge CH ANJ25
- Bio-Rad-System, Hercules, USA: Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer, E.coli-Pulser, Protein-Elektrophoresekammer, Elektroporationsküvette
- Brand, Wertheim, BRD: Chamber-Slides Objektträger, Pipettenspitzen 0.1-10 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl
- Carl-Zeiss, Göttingen, BRD: Fluoreszenzmikroskop Axioskop20
- Eppendorf, Engelsdorf, BRD: Heizblock, Photometer, Thermomixer, Pipetten, Uvette[®]
- Greiner, Longwood, USA: Cryo-Vials 1.8 ml, 50 ml Reagiergefäße
- Hartenstein, Würzburg, BRD: Magnetrührer, pH-Meter, Absaugpumpe, PCR-Gefäße 0.2 ml, Zellschaber 24 mm
- Heraeus, Osterode, BRD: Brutschrank, Laminar-Flow-Hood, Biofuge 28 RS
- Hettich, Tuttlingen, BRD: Zentrifuge ROTANDA/ RFC
- Kodak, Stuttgart, BRD: Digitale Kamera
- Melag, Berlin, BRD: Autoklav
- Perkin-Elmer, Shelton, USA: Sequenzer ABI 310, Thermocycler (Gen-Amp-PCR-System 9700),

- Sarstedt, Nümbrecht, BRD: Reagiergefäße 1.5 ml, Auslaufpipetten 10 ml und 20 ml, Petrischalen für Bakterien

3. Methoden

3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion kann ein DNA-Abschnitt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase um ein Vielfaches amplifiziert werden (47).

Soweit nicht anders beschrieben, wurde der folgende PCR-Ansatz gewählt:

- 5 µl 10x Ex-TaqTM-Puffer
- 4µl dNTP (2.5 mM)
- 1 µl „sense-Primer“
- 1 µl „antisense-Primer“
- 1 µl Ex-TaqTM-Polymerase
- DNA
- Wasser (auf 50 µl)

Wenn in der PCR noch ein zweiter DNA-Abschnitt amplifiziert werden sollte, wurden noch je 1 µl „sense-“ und „antisense-Primer“ für diesen Abschnitt zugegeben.

Diese Zyklusbedingungen wurden verwendet:

96° C	2 min	}	32 x
96° C	45 sec		
50- 65° C	45 sec		
72° C	1 min		
72° C	2 min		

3.2. TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese kann DNA ihrer Größe nach aufgetrennt werden, da kleine DNA-Fragmente durch ein Gel schneller von der Kathode zur Anode wandern als größere.

Es wurden 1.2 %ige TAE-Agarose-Gele mit 0.005 % Ethidiumbromid verwendet. Tankpuffer war TAE, die angelegte Spannung betrug 150 V. Die DNA wurde mit einem DNA-Loading-Puffer versetzt, sie konnte durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch Zugabe eines DNA-Markers war es möglich, einzelne Banden einer bestimmten DNA-Länge zuzuordnen.

3.3. Konzentrationsmessungen mit Photometer

RNA und DNA Konzentrationen in wässriger Lösung können durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm berechnet werden (OD₂₆₀-Methode) (47).

3.4. Enzymatische Reaktionen

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsenzyme an spezifischen Stellen geschnitten werden, weil die Enzyme an bestimmte Basensequenzen binden. Das entstandene DNA-Fragment endet mit einem kurzen, einzelsträngigen DNA-Abschnitt. Dieser DNA-Überhang kann durch Klenow-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Mit demselben Enzym geschnittene DNA-Fragmente verschiedener Herkunft, deren Überhänge zueinander komplementär sind, können mit dem Enzym T4-Ligase verknüpft werden. Auch zwei DNA-Fragmente ohne Überhang (z.B. durch Einwirkung von Klenow-Polymerase) können mit T4-Ligase ligiert werden.

3.4.1. DNA-Restriktion mit Enzymen

Soweit nicht anders beschrieben, wurde eine Standard-Restriktion mit 20 μ l Gesamtvolumen durchgeführt und 3 Stunden bei 37° C inkubiert:

- DNA
- 2 μ l BSA (1 mg/ml)
- 2 μ l Puffer
- 1 μ l Enzym (10 U/ μ l)
- Wasser

3.4.2. Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Polymerase

Um die 3' und 5' Überhänge der verdauten DNA mit Nukleotiden aufzufüllen, wurde ein 50 μ l Ansatz gewählt:

- DNA-Verdau (20 μ l)
- 5 μ l 10x Klenow-Puffer
- 5 μ l 10 mM dNTP, 2 μ l Klenow-Polymerase
- Wasser (auf 50 μ l)

Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 37° C inkubiert; danach wurden die Enzyme 10 Minuten bei 70° C inaktiviert.

3.4.3. Dephosphorylieren mit alkalischer-Phosphatase

Mit Hilfe der alkalischen-Phosphatase wurden die Phosphatgruppen am Ende eines mit einem Restriktionsenzym aufgeschnittenen Plasmids abgespalten. Es konnte nun bei Zugabe von T4-Ligase nicht mehr ligiert werden. Die Plasmide wurden immer dann dephosphoryliert, wenn sie nur mit einem Enzym verdaut wurden (Single-Digest) und ein Insert zwischen die Schnittstellen ligiert werden sollte. Wäre dieser Reaktionsschritt nicht durchgeführt worden, so wäre nicht das Insert in das Plasmid ligiert, sondern das Plasmid religiert worden.

Es wurde ein 100 μ l Ansatz gewählt:

- 20 μ l verdautes Plasmid
- 10 μ l 10X CIAP Puffer
- 2 μ l alkalische-Phosphatase
- Wasser (auf 100 μ l)

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37° C und 15 min bei 56° C inkubiert. 37° C war das Temperaturoptimum für das Enzym, und bei 56° C wurde es inaktiviert. Nach Zugabe von nochmals 2 μ l alkalischer-Phosphatase wurden die beiden Reaktionsschritte ein zweites Mal durchgeführt, um sicherzugehen, dass die Reaktion vollständig abläuft.

3.5. Methoden zum Klonieren eines Plasmids

Unter Klonieren versteht man das Einfügen eines DNA-Abschnittes (Insert) in ein Plasmid (Vektor) und das anschließende Vermehren dieses neu erstellten Plasmids durch Transformation in Bakterien.

3.5.1. Restriktion von Insert und Plasmid mit Enzymen

Zunächst wurde das Insert durch Restriktion mit Enzymen aus einem Plasmid herausgeschnitten. Hierzu wurden zwei das Insert flankierende Enzyme verwendet. Befindet sich strangauf- und abwärts je eine Schnittstelle für dasselbe Enzym und wird das Insert somit nur mit einem Enzym herausgeschnitten, so spricht man von einem Single-Digest. Auch das Plasmid, in welches das Insert ligiert werden sollte, wurde mit Restriktionsenzymen aufgeschnitten. Insert und Vektor konnten nur ligiert werden, wenn die zu verknüpfenden Stellen von demselben Enzym geschnitten worden waren. War dies nicht möglich, so wurden nach Verdau mit Restriktionsenzymen die DNA-Überhänge des Plasmids und des Inserts mit Hilfe von Klenow-Polymerase aufgefüllt und Insert und Plasmid ligiert.

3.5.2. Extraktion von DNA aus einem Gel

Um das Insert und das Plasmid, in welches das Insert kloniert werden sollte, von anderen durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmenten zu isolieren, wurden beide Proben nach dem Verdau auf ein TAE-Agarose-Gel geladen, so dass das Insert und das Plasmid einzeln extrahiert werden konnten. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit[®] herausgelöst.

3.5.3. Ligation von Insert und Plasmid

Insert und Vektor wurden durch das Enzym T4-Ligase verknüpft. Über den Erfolg einer Ligation entscheidet vornehmlich das molare Verhältnis Insert zu Plasmid, was im Idealfall 1:1 betragen sollte. Daher wurden je 3 Ansätze erstellt, die bei gleicher Menge Plasmid unterschiedliche Konzentrationen des Inserts enthielten. In einem vierten Ansatz war kein Insert vorhanden (Kontroll-Probe). Die Reaktionstemperatur betrug 16° C.

- 1 µl Plasmid
- 2 µl Ligase und
- 1 µl Ligase-Puffer
- 0, 1, 2, 4 µl Insert
- Wasser (auf 10 µl)

3.5.4. Plasmidamplifikation in E.coli

Neben einigen anderen Methoden stellen die Elektroporation und die Hitzeschock-Transformation Möglichkeiten dar, Plasmide in Bakterien zu transformieren, um diese durch Anzucht der Bakterien zu vermehren. Nach der Transformation wurden die Bakterien zunächst 1 Stunde in 1 ml antibiotikafreies SOC-Medium gegeben. Dadurch konnten die Bakterien die auf dem Plasmid enthaltenen Antibiotikaresistenzen exprimieren.

Für die Elektroporation mussten die verwendenden Bakterien zunächst elektrokompent gemacht werden (47). 1 Liter LB-Medium wurde mit Bakterien beimpft und über Nacht angezüchtet. Nach Abzentrifugieren des LB-Mediums wurden die Bakterien mehrere Male in destilliertem Wasser suspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Durch diese Waschvorgänge wurden die im LB-Medium vorhandenen Salze entfernt, so dass beim Anlegen von Spannung kein Strom fließen konnte. Die Bakterien konnten als Glycerolstock bei -80°C eingefroren werden.

Für die Transformation wurden ca. 40 μl Bakterien des Glycerolstocks und 1 μl der 10 μl Ligationslösung in eine Elektroporationsküvette gegeben. Mit Hilfe des E. coli-Pulsers der Firma Bio-Rad wurde kurz eine Spannung von 2.5 kV angelegt. Durch diese wurden die Bakterien angeregt, das Plasmid aufzunehmen.

Alternativ zur Elektroporation wurde die Hitzeschock-Transformation benutzt. Die für diese Methode verwendeten Bakterien wurden „ultrakompent“ gemacht, SOB-Medium wurde mit JM109[®]-Bakterien beimpft. Nachdem die Bakterien gewachsen waren, wurde das SOB-Medium abzentrifugiert und die Bakterien in Transformations-Puffer (TB-Puffer) resuspendiert. Der Puffer wurde abzentrifugiert, die Bakterien wurden in TB-Puffer mit 7 % DMSO resuspendiert, aliquotiert und als „ultrakompente-E.coli“ bei -80°C eingefroren. (47)

Zu 1 μl des Ligationsansatzes wurden 100 μl „ultrakompente-E.coli“ Bakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, exakt 90 Sekunden auf 42°C erhitzt, und nach 1 Minute auf Eis in 500 μl SOC-Medium gegeben.

Nachdem die transformierten Bakterien ca. eine Stunde im SOC-Medium gewachsen waren, wurden hiervon 250 μl auf antibiotikahaltigen LB-Nährmedienplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden waren auf den LB-Platten Bakterienkolonien gewachsen, außer auf der Platte der Bakterien, die mit der Kontroll-Ligation (kein Insert) transformiert worden waren. Mehrere 50-ml-Reagiergefäße mit 10 ml antibiotikahaltigem LB-Medium wurden mit je einer der gewachsenen Kolonien beimpft, so dass sich in jedem Reagiergefäß nur Bakterien eines Klons befanden.

Nachdem sich die Bakterien vermehrt hatten, konnten mittels Mini-DNA-Präparation die Plasmide aus den Bakterien isoliert werden.

Um die in die Bakterien transformierten und durch das Bakterienwachstum vermehrten Plasmide zu isolieren, wurde eine Mini-DNA-Präparation durchgeführt. Hierbei wurde nach dem Protokoll des RPM-Kit[®] vorgegangen.

3.5.5. DNA-Sequenzierung

Im Gegensatz zur Amplifizierungs-PCR wurden bei der Sequenzierungs-PCR neben den normalen Deoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszierende Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet. Diese verursachen nach ihrem Einbau einen Strangabbruch. Jedes der 4 verschiedenen fluoreszierenden Nukleotide (C, A, G, T) verursachte Fluoreszenz in charakteristischer Wellenlänge. Es wurde nur ein Primer verwendet. Nach 25 Zyklen erhielt man so unterschiedlich lange DNA-Einzelstränge, an deren Ende sich ein fluoreszierendes Nukleotid befand. Es wurde folgender Ansatz gewählt:

- 8 µl Big-Dye-Mix
- 1 µl Primer (3.3 µg/µl)
- 0.5-1 µg DNA
- Wasser (auf 20 µl)

Im Big-Dye-Mix waren Deoxyribonukleotide (dNTPs), fluoreszierende Dideoxyribonukleotide (ddNTPs), Puffer und Polymerase enthalten.

Die Zyklusbedingungen waren:

94° C	5min	} 25x
96° C	30sec	
50° C	15sec	
60° C	5min	

Das Aufreinigen der PCR-Proben wurde nach dem Protokoll *Auto-SeqTM G-50[®]* durchgeführt. Die verwendeten Harzsäulen wurden von großen Molekülen schneller durchlaufen als von kleinen. Dadurch wurden die in der PCR zugegebenen Nukleotide, die nicht als Kette gebunden wurden, herausgefiltert. Die DNA der aufgereinigten Proben wurde mit Isopropanol gefällt (47), und das Pellet wurde in TSR[®] resuspendiert.

Sequenziert wurde mit dem automatischen Sequenzierer ABI 310. Im Sequenzierer liefen die Proben mittels Elektrophorese durch ein Kapillar-Elektrophorese-Gel. Dort wurden sie bis auf Nukleotid-Ebene nach ihrer Größe aufgetrennt. Das sich am Ende eines Stranges befindende fluoreszierende Nukleotid wurde beim Durchtritt durch eine Kapillare mit einem Laser bestrahlt und konnte anhand seiner charakteristischen Fluoreszenz der entsprechenden Base zugeordnet werden. Mit dieser Methode ist es möglich, 200-400 Basenpaare lange DNA-Abschnitte zu sequenzieren.

3.5.6 DNA-Präparation (Maxi)

Wie bei der Mini-DNA-Präparation wurden bei der Mini-Monster-DNA-Präparation Plasmide aus Bakterien isoliert. Während mit der Mini-DNA-Präparation Plasmide aus Bakterien, die in 10 ml LB-Medium gewachsen waren, isoliert wurden, wurde dieses bei der Mini-Monster-DNA-Präparation mit Bakterien aus 1 Liter LB-Medium durchgeführt.

3.6. Klonieren des Plasmids p8pEGFP-c1MG

Um Aufschlüsse über die subzelluläre Lokalisation von p8 zu erhalten, wurde ein Plasmid kloniert, das für ein Fusionsprotein aus p8 und GFP (grün fluoreszierendes Protein) kodiert. p8-cDNA wurde „in frame“ (im Leseraster) an das 3' Ende der GFP-cDNA kloniert, so dass sich p8 am C-terminalen Ende des GFP befand. Zu diesem Zwecke wurde p8-cDNA aus dem Plasmid pCRII-Topo als EcoRI Fragment ausgeschnitten. Bei Ligation des Fragmentes in die EcoRI Schnittstelle der Multiple-

Cloning-Side (MCS) des Plasmids pEGFP-c1 käme es zu einer Verschiebung des Leserasters um 2 Basen, und p8 würde nicht mehr korrekt abgelesen werden.

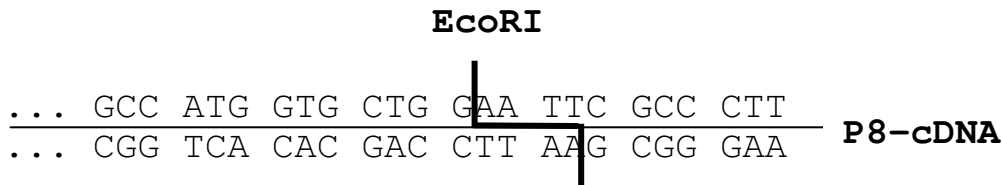


Abb.3.1.: pcrII-Topo. Basensequenz der Multiple-Cloning-Side (MCS) des Plasmids pcrII-Topo. In dieses Plasmid war von *Seufert* p8-cDNA kloniert worden.

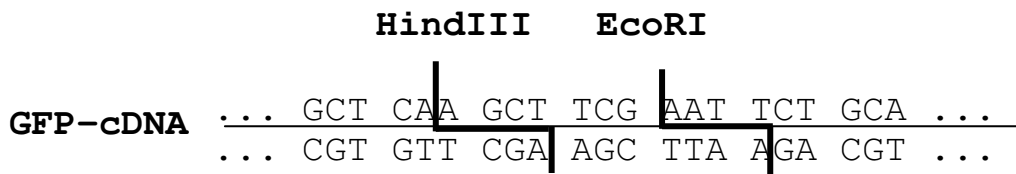


Abb.3.2.: pEGFP-c1. Ausschnitt der Basensequenz der Multiple-Cloning-Side des Plasmids pEGFP-c1. Eingezeichnet sind die Schnittstellen von HindIII und EcoRI.

Daher wurde die MCS des Plasmids pEGFP-c1 so verändert, dass es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters kommen konnte. Das so entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pEGFP-c1MG. Durch Ligation von p8 in diesen Vektor entstand das Plasmid p8pEGFP-c1MG.

3.6.1. Modifizieren des Plasmids pEGFP-c1 zu pEGFP-c1MG

Das Plasmid pEGFP-c1 wurde mit HindIII geschnitten.

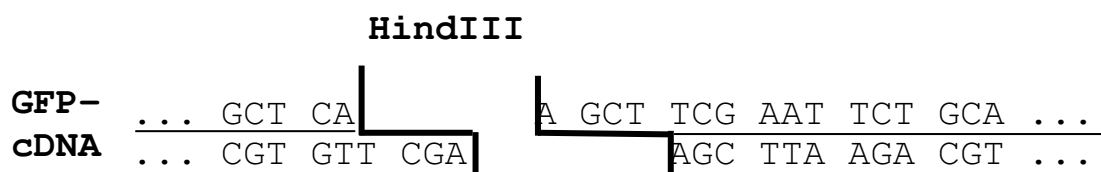


Abb. 3.3.: pEGFP-c1. Ausschnitt der Basensequenz der MCS des Plasmids pEGFP-c1, das mit HindIII geschnitten wurde.

Durch Reaktion mit Klenow-Polymerase wurden die Enden des geschnittenen Plasmides mit Nukleotiden aufgefüllt, wodurch ein Zugewinn von 4 Basenpaaren entstand.

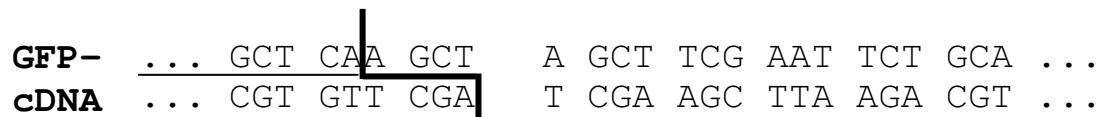


Abb.3.4.: pEGFP-c1. Ausschnitt der Basensequenz der MCS des Plasmids pEGFP-c1. Das Plasmid wurde mit HindIII geschnitten und die Überhänge durch Klenow-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt.

Durch die Ligation wurde das Leseraster um ein Basenpaar verschoben:

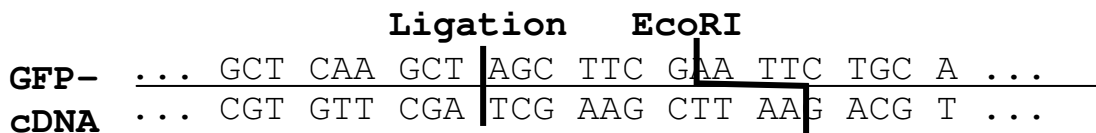


Abb.3.5.: pEGFP-c1MG. Ausschnitt der Basensequenz des veränderten und religierten Plasmids pEGFP-c1. Dieses neuentstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pEGFP-c1MG. Eingezeichnet ist die Schnittstelle für EcoRI und die Stelle, die ligiert wurde.

Das so modifizierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pEGFP-c1MG und wurde, wie oben beschrieben, amplifiziert.

3.6.2. Subklonieren von p8-cDNA in pEGFP-c1MG als EcoRI-Fragment

Das Plasmid pEGFP-c1MG wurde mit einem EcoRI-Single-Digest verdaut. Damit das Plasmid nicht religierte, wurde es mit alkalischer-Phosphatase dephosphoryliert. p8-cDNA wurde durch einen EcoRI-Verdau aus dem Vektor pcrII-Topo geschnitten. Beide Proben wurden auf ein Gel geladen, p8-cDNA wurde bei ca. 350 bp (Basenpaaren), das linearisierte Plasmid pEGFP-c.1MG bei ca. 4.7 Kb (Kilo Basenpaaren) ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Durch Ligation entstand das Plasmid p8pEGFP-c1MG.

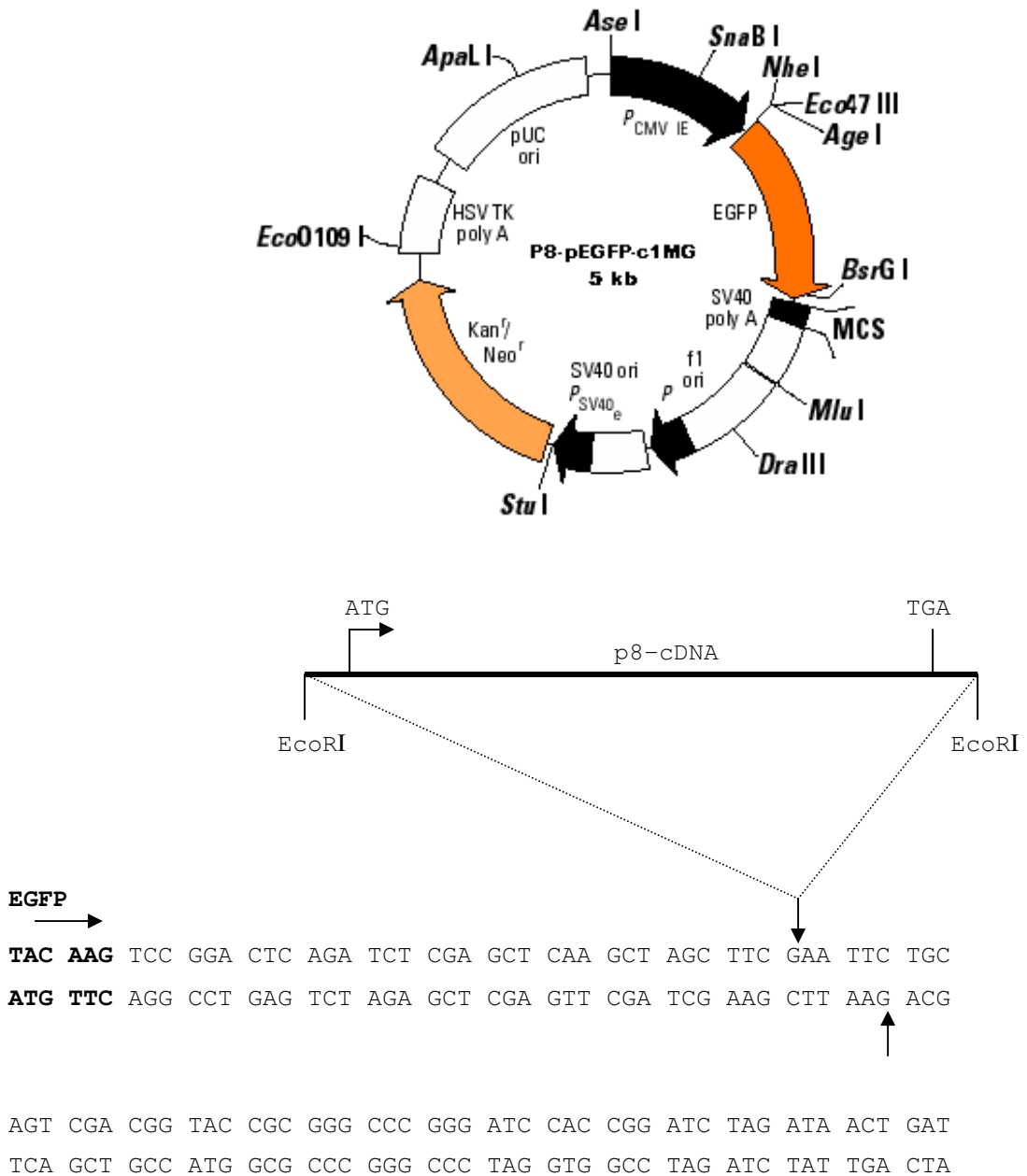


Abb. 3.6.: p8pEGFP-c1MG: p8-cDNA wurde als EcoRI Fragment in die MCS des Plasmids pEGFP-c1MG kloniert.

3.7. Klonieren des Plasmids p8pEGFP-c1MG-NLS-

Um den Abschnitt des p8 zu finden, der für den Transport des Proteins in den Zellkern verantwortlich ist (nukleäres Lokalisationssignal NLS), wurde ein Deletionskonstrukt der p8-cDNA in das Plasmid pEGFP-c1MG kloniert. Hierzu wurde der C-terminale Abschnitt des p8 deletiert, bei dem es sich auf Grund der bekannten Aminosäuresequenz um ein putatives NLS handeln könnte. In der DNA-Sequenz waren keine spezifischen Schnittstellen für Restriktionsenzyme vorhanden, mit denen die putative NLS-Sequenz exakt herausgeschnitten hätte werden können. Daher wurde die p8-cDNA ohne die putative NLS-Sequenz mittels PCR amplifiziert und als EcoRI-Fragment in das Plasmid pEGFP-c1MG ligiert. Als Primer wurden EGFP-1 und p8-EcoB verwendet. EGFP-1 war komplementär zum 3' Ende der Basensequenz der GFP-cDNA; p8-EcoB zur p8-cDNA „upstream“ von der NLS-cDNA. p8-EcoB enthielt eine EcoRI Schnittstelle.

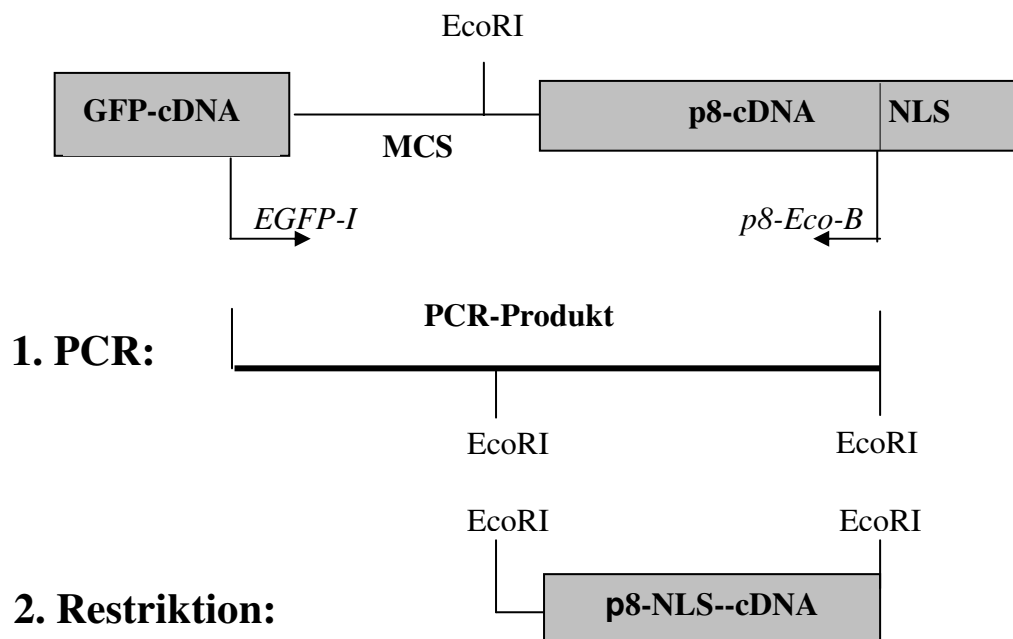


Abb.3.7.: Klonierungsstrategie für p8pEGFP-c1MG-NLS-. Das Plasmid p8pEGFP-c1MG diente als Vorlage für eine PCR. Primer waren EGFP-1 und p8-Eco-B. Das PCR Produkt wurde mit EcoRI verdaut und die p8-cDNA (ohne NLS) in das Plasmid pEGFP-c1MG ligiert.

Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI geschnitten, auf ein Gel geladen und extrahiert. Das Plasmid pEGFP-c1MG wurde ebenfalls mit EcoRI geschnitten und dann mit alkalischer-Phosphatase dephosphoryliert. Mit Hilfe der T4-Ligase wurde das Insert in das Plasmid ligiert. Das neu entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung p8pEGFP-c1MG-NLS-.

3.8. Klonieren des Plasmids p8-pOPRSV1

Um p8 in INS-1-Zellen stabil induzierbar überexprimieren zu können, wurde p8-cDNA in das Plasmid pOPRSV1-CAT kloniert. Das Plasmid hatte zwei die CAT-Untereinheit flankierende NotI-Schnittstellen (bei 3061 und 3838 Basenpaaren), zwischen die die p8-cDNA unter Verlust der CAT-Untereinheit ligiert wurde. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pOPRSV1-CAT mit NotI geschnitten, die Überhänge mittels Klenow-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt und mit alkalischer-Phosphatase dephosphoryliert. p8-cDNA wurde mit EcoRI aus dem Plasmid p8pEGFP-c1MG ausgeschnitten und die Überhänge ebenfalls aufgefüllt. Plasmid und Insert wurden mit T4-Ligase ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung p8-pOPRSV1.

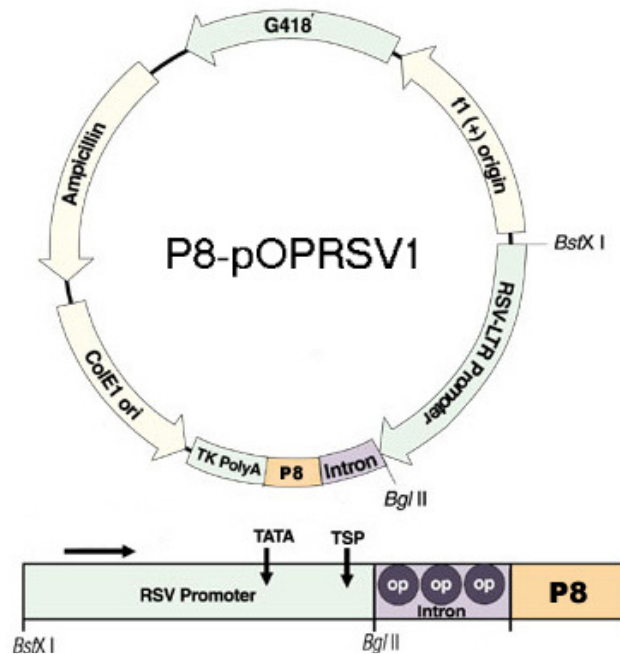


Abb. 3.8.: p8-pOPRSV1. p8-cDNA wurde in das Plasmid pOPRSV1-CAT kloniert.

3.9. Zellkultur

Als Zelllinien wurden INS-1-Zellen (Modell für β -Zellen), AR42J-Zellen (Modell für pluripotente Vorläuferzellen) und Cos-7-Zellen (Nierentumorzellen) verwendet. Die Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert

3.9.1. Transfektion von Zellen mit Lipofectamine®

Mit Lipofectamine® wurden sowohl stabile als auch transiente Transfektionen von Plasmiden durchgeführt. Es wurden Zellen auf Objektträgern und in 10-cm-Zellkulturschalen transfiziert.

Für die Transfektion der Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen wurden 20 µg DNA und 30 µl Lipofectamine[®] mit 800 µl TX-Medium vermischt, für die Objektträger 2 µg DNA und 3 µl Lipofectamine[®] mit 100 µl TX-Medium. Der Ansatz wurde auf die halbkonfluenten Zellen gegeben. Die Zellen erhielten zunächst TX-Medium und 12 Stunden später normales Medium.

3.9.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzversuche wurden konfluente INS-1-, Cos-7- und AR42J-Zellen von einer 10-cm-Zellkulturschale abtrypsinisiert und im Verhältnis 1:30 auf Chamber-Slides-Objektträger gesplittet. Diese waren beschichtet, so dass die Zellen auf der Oberfläche anwachsen konnten. Die Zellen wurden dort im halbkonfluenten Zustand mit den GFP-Plasmiden transfiziert. Nach 24, 48, 72 Stunden wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und die Zellen analysiert. Durch Bestrahlen der Zellen mit Licht der Wellenlänge 488 nm bis 507 nm wurde das grün-fluoreszierende-Protein (GFP) zum Fluoreszieren angeregt.

3.9.3. Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Konzentration von Zellen in einer Lösung bestimmt werden. Die Kammer enthält Quadrate, deren Volumen 0.1mm^3 beträgt. Durch Auszählen mehrerer dieser Quadrate, Bildung des arithmetischen Mittels und Multiplizieren mit 10000 wurde die Zellmenge pro ml bestimmt. Die zu zählenden Zellen wurden von den Zellkulturschalen abtrypsinisiert, abzentrifugiert, in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und ausgezählt.

3.10. Etablierung von INS-1-Zelllinien mit stabiler p8-Überexpression

3.10.1. Stabile Transfektion von INS-1-Zellen

Man unterscheidet transiente und stabile Transfektion. Wenn Zellen mit einem Plasmid transfiziert werden, so befindet sich dieses im Zytoplasma der Zellen. Die Zelle befördert es nach Stunden in den Extrazellulärraum. Außerdem liegt die Transfektions-Effizienz einer derartigen transienten Transfektion abhängig von der Zelllinie bei 5-20 % (Schätzung nach GFP-Transfektionsexperimenten). Einige wenige Zellen nehmen das Plasmid stabil auf, indem sie es in die nukleäre DNA integrieren.

Es wurden mit Hilfe des Lac-Switch-Systems[®] doppelt stabile INS-1-Zelllinien etabliert (1. Transfektion: P3´SS, 2. Transfektion: p8-pOPRSV1). Um die stabile Integration in den Zellkern zu erleichtern, wurden die Plasmide vor der Transfektion linearisiert, indem sie mit einem Enzym geschnitten wurden, welches das Plasmid nur einmal schnitt.

P3´SS wurde in einem 100 µl Ansatz mit NaeI geschnitten:

- 23 µg Plasmid
- 10 µl Puffer-A
- 10 µl BSA
- 10 µl NaeI
- 55 µl Wasser

(Inkubation: 3 Stunden, 36° C)

Für p8-pOPRSV1 wurde ein 50 µl Ansatz gewählt:

- 25 µg Plasmid
- 5 µl BSA
- 5 µl Puffer J
- 4µl SacI
- 11 µl Wasser

(Inkubation: 3 Stunden, 36° C)

Die Linearisierung der Plasmide wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft.

Drei 10-cm-Zellkulturplatten INS-1-Zellen wurden mit dem entsprechenden linearisierten Plasmid transfiziert, eine Zellkulturschale diente als „Kontroll-Platte“ und wurde nur mit Lipofectamine[®] behandelt. Um die wenigen stabil transfizierten Zellen von den vielen transient oder gar nicht transfizierten Zellen zu trennen, wurde dem Zellmedium ein zytotoxisches Antibiotikum beigegeben, für das ein Resistenzgen auf dem Plasmid vorhanden war.

Es wuchsen einzelne Klone stabil transfizierter Zellen, die isoliert und expandiert wurden. Für die erste stabile Transfektion mit P3´SS wurden dem INS-1-Zellmedium 0.02 % Hygromycin beigegeben. Diese mit P3´SS stabil transfizierten Zellen wurden mit p8-pOPRSV1 ein zweites Mal stabil transfiziert. Zur Selektion wurde dem Medium 0.18 mg/ml G418[®] (Neomycinderivat) beigegeben. Mit Hilfe der „Kontroll-Platte“ wurde der Zeitpunkt bestimmt, die Selektionsdosis der Antibiotika auf eine Erhaltungsdosis zu reduzieren (0.01 % Hygromycin, 0.09 mg/ml G418[®]).

3.10.2. Prinzip des Lac-Switch-Systems[®]

Zum Etablierung der induzierbar stabilen Zelllinien wurde das Lac-switch-System[®] verwendet. Dieses System basiert auf dem Lac-Operon-Modell von E.coli Bakterien.

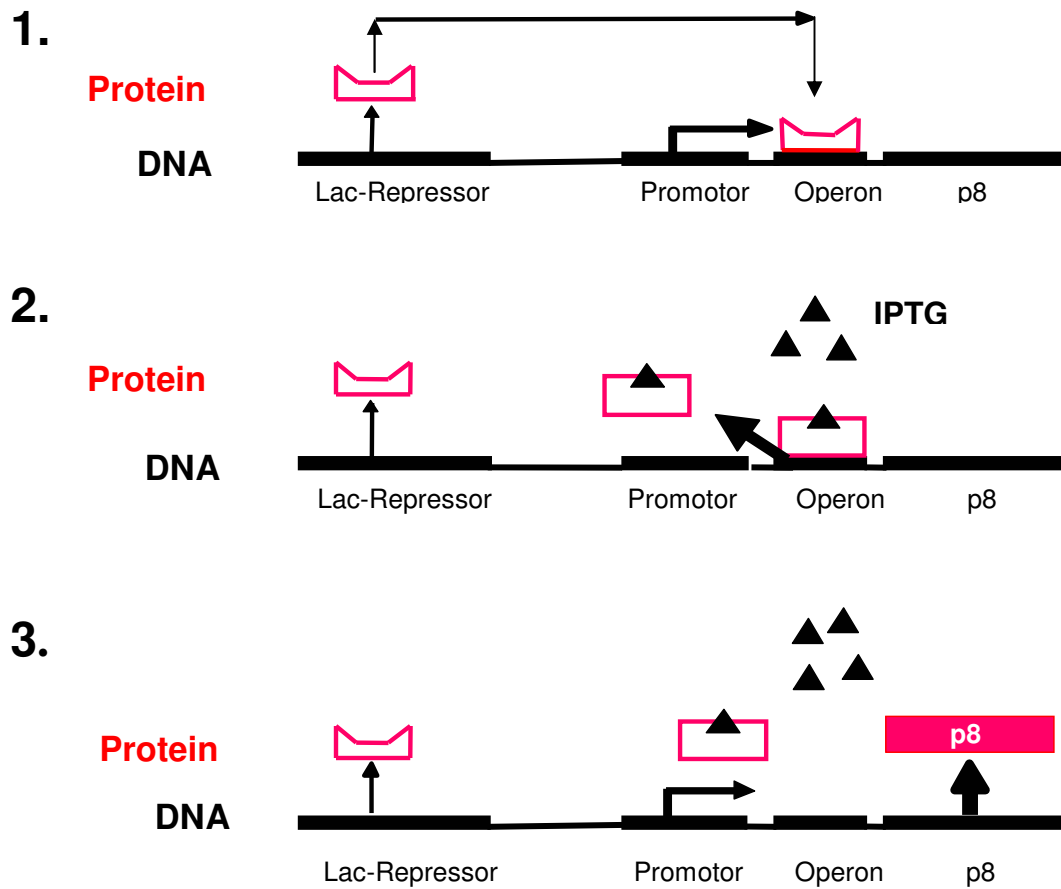


Abb.3.7.: Prinzip des Lac-Switch Systems®: Der Lac-Repressor bindet an das Operon und verhindert die Expression von p8. Durch Zugabe von IPTG (Lactosederivat) wird der Lac-Repressor inaktiv und p8 wird synthetisiert.

P3'SS kodiert für den Lac-Repressor, mit p8-pOPRSV1 wurde der Komplex aus Promotor, Operon und p8 in die Zelle integriert. Der Lac-Repressor ist ein Protein, das sich an das Operon anlagert und somit die Expression von p8 verhindert. Zugabe des Laktosederivats IPTG führt zu einer Konformitätsänderung des Lac-Repressors. Dadurch ist dieser nicht mehr in der Lage, an das Operon zu binden. p8 wird somit

transkribiert. Wurden die induzierbar stabilen Zellen mit IPTG stimuliert, wurde p8 überexprimiert, ohne IPTG nicht.

3.11. Western-Blot

Ein Western-Blot ist eine Methode, die dem Nachweis von Proteinen dient. Zunächst wurde ein Whole-Cell-Extract erstellt, um Proteine von Zellmembranbestandteilen (Lipiden usw.) zu trennen. Mittels Elektrophorese wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und durch das Anlegen einer elektrischen Spannung in vertikaler Richtung zum Gel auf eine Nitrozellulose-Membran fixiert. Dort konnte das zu untersuchende Protein durch Immunodetektion sichtbar gemacht werden.

3.11.1. Whole-Cell-Extract

800 µl RIPA-Puffer (mit 1 % PMSF und 0.1 % DTT und Protease-Inhibitor) wurde auf die zu untersuchenden Zellen (10-cm-Zellkulturschalen) gegeben, welche dann von der Zellkulturschale abgeschabt wurden. Durch Zentrifugieren konnten die Zellmembranbestandteile abgetrennt werden.

3.11.2. Polyacrylamid (PAA)-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Zu 10 µl Whole-Cell-Extract wurden 10 µl Protein-Loading-Puffer (mit Urea und β -Mercaptoethanol) und, nach kurzem Erhitzen auf 100° C, 0.5 µl DTT gegeben. Die Proben wurden auf das Gel geladen, welches aus 2 Teilgelen bestand (Stacking-Gel und Separating-Gel). Es wurden ein 4,5 % Stacking-Gel (4.5 % PAA, Stacking-Puffer, 0.06 % TEMED, 0.15 % APS) und ein 12 % Separating-Gel (12 % PAA, Separating-Puffer, 0.06 % TEMED, 0.15 % APS) verwendet. Während die Proteine das Stacking-Gel durchliefen, wurde eine Spannung von 20 V angelegt, die bei Durchlaufen des Separating-Gel auf 40 V erhöht wurde.

3.11.3. Fixieren der Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran

Die Proteine wurden im Semidry-Verfahren vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran fixiert. Der „Semidry-Sandwich“ wurde von der Kathode zur Anode wie folgt aufgebaut: Kathode, 3 in CAPS-Puffer getränkte Filter, das PAA-Gel, die Nitrozellulose-Membran, ein in A2-Puffer und 2 in A1-Puffer getränkte Filter, Anode. Die angelegte Spannung wurde so gewählt, dass pro cm² Nitrocellulose-Membran ein Strom von 0.8 mA floss.

3.11.4. Immunodetektion

Die auf die Nitrocellulose-Membran fixierten Proteine wurden durch Immunodetektion sichtbar gemacht. Es wurden 2 Antikörper verwendet: ein primärer Antikörper, um spezifisch an das zu untersuchende Protein zu binden, ein sekundärer, um den primären Antikörper zu detektieren. Der sekundäre Antikörper war mit einem Enzym markiert, welches ECL[®] in einen lumineszierenden Zustand umwandelte. Dadurch konnte ein Film belichtet werden, welcher für das zu untersuchende Protein Banden zeigte.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulose-Membran zu verhindern, wurde diese ca. 1 Stunde mit einem Blocking-Puffer inkubiert (PBS, 5 % Milchpulver, 0.05 % Tween[®]). Für die weiteren Schritte wurde ein Washing-Puffer verwendet (PBS, 0.05 % Tween[®]), mit welchem die Membran einige Male gewaschen wurde. Mit diesem Puffer vermischt wurden auch die Antikörper auf die Membran gegeben, wobei der erste Antikörper über eine Stunde und der zweite genau 40 Minuten inkubierten. Zwischen den einzelnen Inkubationsvorgängen wurde die Membran jeweils einige Male mit dem Washing-Puffer gewaschen. Die Membran wurde 1 Minute mit ECL[®] inkubiert, der Film 20 Sekunden belichtet und entwickelt.

3.12. Semiquantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Mit einer semiquantitativen Reverse-Transkriptions-PCR kann die Expression einer mRNA untersucht werden. Es wurde zunächst die gesamte RNA (mRNA, tRNA und rRNA) der Zellkultur extrahiert. Um DNA-Kontamination zu verhindern, wurden die Proben mit DNase1 verdaut. Die mRNA besitzt, im Gegensatz zur rRNA und tRNA, an ihrem 3' Ende einen Poly-A-Schwanz. Da als Primer für die Reverse-Transkription Oligo(dt) eingesetzt wurde, wurde nur die mRNA durch das Enzym Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Vorlage für eine PCR, die anschließend auf ein 1,2 % Agarose-Gel aufgetragen wurde. Es wurden Primer für das zu untersuchende Gen (p8) und Primer für ein Strukturgen (β -Aktin) verwendet. Dieses Strukturgen diente dem Vergleich der Menge der eingesetzten RNA. Mit dem Computerprogramm Scion-Image[®] konnten nun Mengenveränderungen der mRNA einer Probe relativ zu einer anderen Probe ermittelt werden. Eine semiquantitative RT-PCR dient nur dem Vergleich zweier oder mehrerer Proben. Eine Aussage über die absolute Menge an mRNA kann nicht getroffen werden.

3.12.1. RNA-Extraktion mit Trizol[®]

Zunächst wurde die gesamte RNA der zu untersuchenden Zellkultur mit der Trizol[®] extrahiert. Hierbei wurde das Protokoll der Firma Gibco, Life Technologies verwendet. Die sich auf 10-cm-Zellkulturschalen befindenden INS-1-Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit je 1 ml Trizol[®] versehen und abgeschabt. Durch Zugabe von 200 μ l Chloroform und anschließender Zentrifugation konnte eine Phasentrennung erreicht werden, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt. Nach Fällung der RNA mit Isopropanol und Waschen mit Ethanol wurde sie in 30 μ l Wasser resuspendiert.

3.12.2. DNase1-Verdau

Um die RNA vollständig von DNA-Kontamination zu reinigen, wurde ein DNase1-Verdau angesetzt.

- 50 µg RNA
- 1 µl DNase1
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 5 µl TrisCl (0.1 M)
- 5 µl KCl (0.5 M)
- 5 µl MgCl₂ (15 mM)
- Wasser (auf 76 µl)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37° C inkubiert. Die Zugabe von 50 µl Phenol/ Chloroform und eine anschließende Zentrifugation bewirkten eine Phasentrennung, durch die es möglich war, die DNase zu entfernen. Die RNA wurde mit 200 µl 100 % Ethanol und 5 µl Natriumacetat (3 M) gefällt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen.

3.12.3. Reverse-Transkription

Aus der vorliegenden gesamten RNA (mRNA, tRNA, und rRNA) der Zellen wurde selektiv die Messenger-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Von jeder RNA-Probe wurde je ein Ansatz erstellt, der Reverse-Transkriptase enthielt (RT+), und einer, der das Enzym nicht enthielt (RT-). Hierdurch wurde überprüft, ob im DNase1-Verdau die gesamte DNA denaturiert worden war. Es wurde nach dem Protokoll von Gibco, Life Technologies (SuperscriptTM2 Reverse-Transkriptase) vorgegangen.

3.12.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Von der cDNA wurden mittels PCR zwei Gene amplifiziert: Das zu untersuchende Gen (p8) und ein Strukturgen (β -Aktin). Die Versuchsansätze wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.12.5. 1.2 % TAE-Agarose-Gel und Auswertung

Die PCR Produkte wurden auf ein Agrose-Gel aufgetragen und die Stärke der Banden mit dem Computerprogramm Scion-Image[®] ausgewertet.

3.13. Statistik:

3.13.1. Median-Test mit Vierfelder-Chi-Quadrat-Test und Fischer-Yeats-Test

Die aufgeführten Verfahren dienen dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bezüglich eines Alternativmerkmals.

Diese Tests nutzen die ordinale Information (die absolute Höhe des jeweiligen Wertes) nur insoweit, als zu entscheiden ist, ob der jeweilige Wert oberhalb oder unterhalb eines für die einzelnen Zeiten errechneten Medianwertes liegt. Der Medianwert ist definiert als der Wert, bei dem sich 50 % aller Werte oberhalb und 50% unterhalb befinden.

Die zu überprüfende Nullhypothese lautete:

- H_0 : Die beiden zu vergleichenden Stichproben (mit und ohne p8-Überexpression) entstammen aus Populationen mit identischem Median.

Die einseitige Alternativhypothese lautete:

- H_1 : Die Stichprobe der p8-überexprimierenden Zellen entstammt aus einer Population mit höherem Median als die Stichprobe der Zellen ohne p8-Überexpression.

Zunächst wurde für jeden Zeitpunkt der entsprechende Median (M_d) errechnet und je eine Vierfelder-Tafel erstellt.

	Mit p8	Ohne p8	Summe
Größer Md	a	b	a+b=N ₁
Kleiner Md	c	d	c+d=N ₂
Summe	a+c	b+d	N

Die Vierfelder-Tafeln für die Zeiten 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden addiert und das Signifikanzniveau mittels Vierfelder-Chi-Quadrat-Test und Fischer-Yeats-Test errechnet.

Für den Vierfelder-Chi-Quadrat-Test wurden die Werte in diese Formel eingesetzt:

$$\chi^2 = \frac{N \times (ad - bc)^2}{(a+b) \times (c+d) \times (a+c) \times (b+d)}$$

Für den errechneten Wert wurde das Signifikanzniveau ermittelt (8).

Alternativ hierzu wurde mit dem exakteren, aber rechnerisch aufwendigeren Fischer-Yeats-Test die Punktwahrscheinlichkeit P_1 errechnet:

$$P_1 = \frac{(a+b)! \times (c+d)! \times (a+c)! \times (b+d)!}{N! \times a! \times b! \times c! \times d!}$$

Nun wurde für die Punktwahrscheinlichkeit P_2 in jeder Stichprobe ein Individuum in Richtung auf die Erwartung in H_1 „verschoben“. Für den vorliegenden Fall wurde somit P_2 errechnet, indem in die obige Formel a+1 (statt a), b-1 (statt b), c-1 (statt c) und d+1 (statt d) eingesetzt wurde. Für P_3 wurde jeweils ein Individuum mehr in

Richtung H_1 verschoben, so dass sich $a+2$ (statt a), $b-2$ (statt b), $c-2$ (statt c) und $d+2$ (statt d) ergaben. Dieses wurde fortgesetzt, bis ein Feld (a , b , c oder d) 0 erreichte. Die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachtete Verteilung zufällig zustande kommt (H_0), ergibt sich aus der Summe der Punktwahrscheinlichkeiten: $P=P_1+P_2+P_3+\dots$

3.12.2. U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon)

Der U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) dient dem Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben (40). Im Gegensatz zum t-Test muss keine Normalverteilung vorliegen (nichtparametrischer Test). Die einzelnen Werte der zu untersuchenden Stichproben wurden ihrer Größe nach angeordnet und erhielten Rangplätze. In die Berechnung gingen somit nicht die Stichprobenwerte selbst ein, sondern ihre Ränge. Für beide Stichproben wurden Rangsummen gebildet und miteinander verglichen.

Die zu überprüfende Nullhypothese lautete:

- H_0 : Die Mittelwerte beider Stichproben sind gleich.

Die einseitige Alternativhypothese lautete:

- H_1 : Die Mittelwerte der Stichproben mit p8-Überexpression sind höher als die der Stichproben ohne p8-Überexpression.

3.12.3. Nichtparametrischer ANOVA und Dunnett's-Test

Die Mittelwerte von mehr als 2 Stichproben können mittels Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiedlichkeit untersucht werden (37). Wenn eine Normalverteilung der Grundgesamtheiten der einzelnen Stichproben nicht nachgewiesen werden kann, ist ein nichtparametrischer ANOVA zu verwenden.

Hierbei lautete die Nullhypothese:

- H_0 : Die Mittelwerte aller Stichproben sind gleich.

Die Alternativhypothese lautete:

- H_1 : Der Mittelwert mindestens einer Stichprobe unterscheidet sich von den Mittelwerten der anderen Stichproben.

Durch die Varianzanalyse (ANOVA) kann nicht geklärt werden, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Bei Annahme der Alternativhypothese kann mit verschiedenen Tests ermittelt werden, zwischen welchen Mittelwerten Unterschiede bestehen. Der Dunnett's-Test vergleicht eine Kontrollstichprobe (0 h p8-Überexpressionszeit) mit allen anderen Stichproben (24 h, 48 h, 72 h, 96 h p8-Überexpressionszeit). Unterschiede zwischen den anderen Stichproben (24 h, 48 h, 72 h, 96 h p8-Überexpressionszeit) können mit diesem Test nicht ermittelt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Subzelluläre Lokalisation des Proteins p8

Für die Charakterisierung eines Proteins sind Informationen über die intrazelluläre Lokalisation von Bedeutung, da sie Rückschlüsse auf den Wirkungsort zulassen.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid p8pEGFP-c1MG kloniert, das für ein Fusionsprotein aus p8 und GFP (grün fluoreszierendes Protein) kodiert. Durch Licht der Wellenlänge 488 bis 507 nm konnte das GFP und somit auch das Fusionsprotein zum Fluoreszieren angeregt werden. Es wurde transfiziert in Cos-7-Zellen (Nierentumorzellen), INS-1-Zellen (Modell für β -Zellen des endokrinen Pankreas) und in AR42J-Zellen (Modell für duktaale Vorläuferzellen, die zu exokrinen und endokrinen Pankreaszellen differenzieren können). Die Zelllinien wurden auf Objektträgern im halbkonfluenten Zustand transfiziert. Nach 24, 48, und 72 Stunden wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In gleicher Weise wurden die drei Zelllinien mit dem „Leervektor“ pEGFP-c1MG, der für das GFP kodiert, transfiziert. Dadurch war es möglich, die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins GFP-p8 mit der des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) zu vergleichen. (Abb.4.1. - 4.3.)

4.2. Identifikation eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im Protein p8

Die Aminosäuresequenz von p8 spricht dafür, dass sich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) am C-terminalen Ende des Proteins befindet. Daher wurde das Plasmid p8pEGFP-c1MG-NLS- kloniert. Dieses Plasmid kodiert für GFP-p8-NLS-, ein Deletionskonstrukt des Fusionsproteins, bei dem das putative NLS deletiert wurde. Es wurden wieder Cos-7-, INS-1- und AR42J-Zellen auf Objektträgern transfiziert und zeitabhängig (24, 48 und 72 Stunden) analysiert. (Abb.4.1.-4.3.)

Cos-7-Zellen

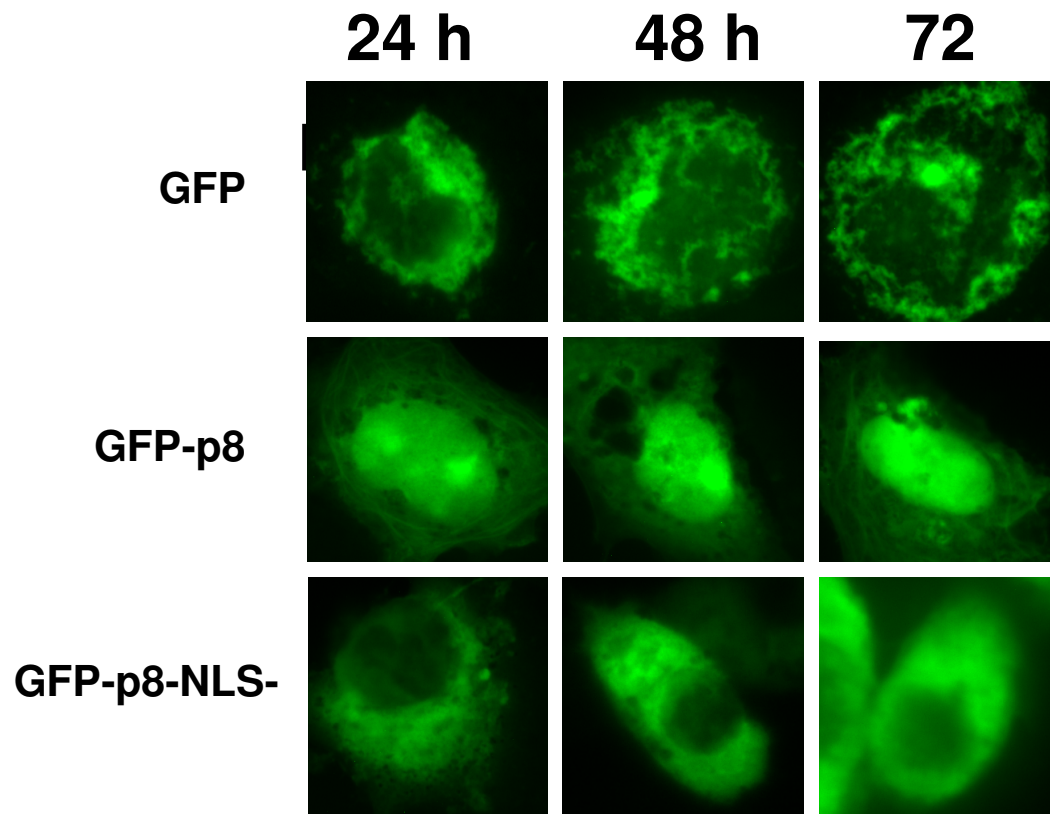


Abb. 4.1.: Subzelluläre Lokalisation von GFP-p8 in Cos7-Zellen: Transiente Transfektion von Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für GFP, das Fusionsprotein GFP-p8 und das Deletionskonstrukt GFP-p8-NLS- kodierten, und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (*Fluoreszenzmikroskopie*)

INS-1-Zellen

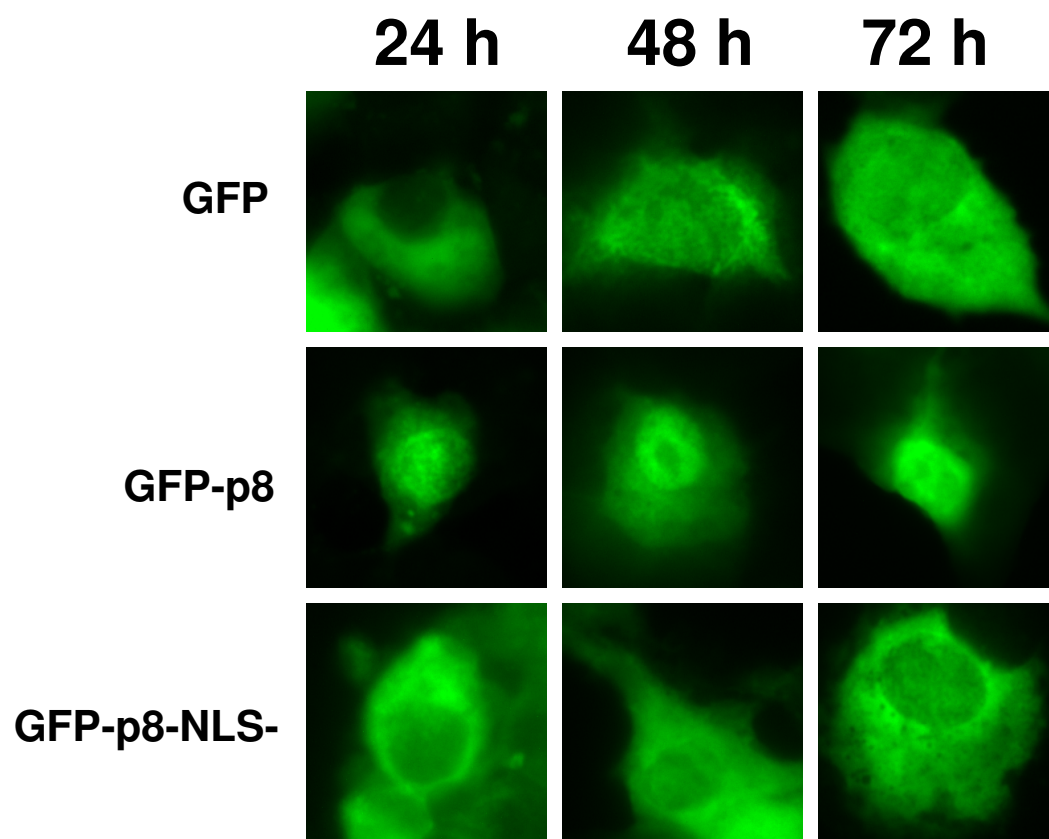


Abb. 4.2.: Subzelluläre Lokalisation von GFP-p8 in INS-1-Zellen: Transiente Transfektion von INS-1-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für GFP, das Fusionsprotein GFP-p8 und das Deletionskonstrukt GFP-p8-NLS- kodierten, und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (*Fluoreszenzmikroskopie*)

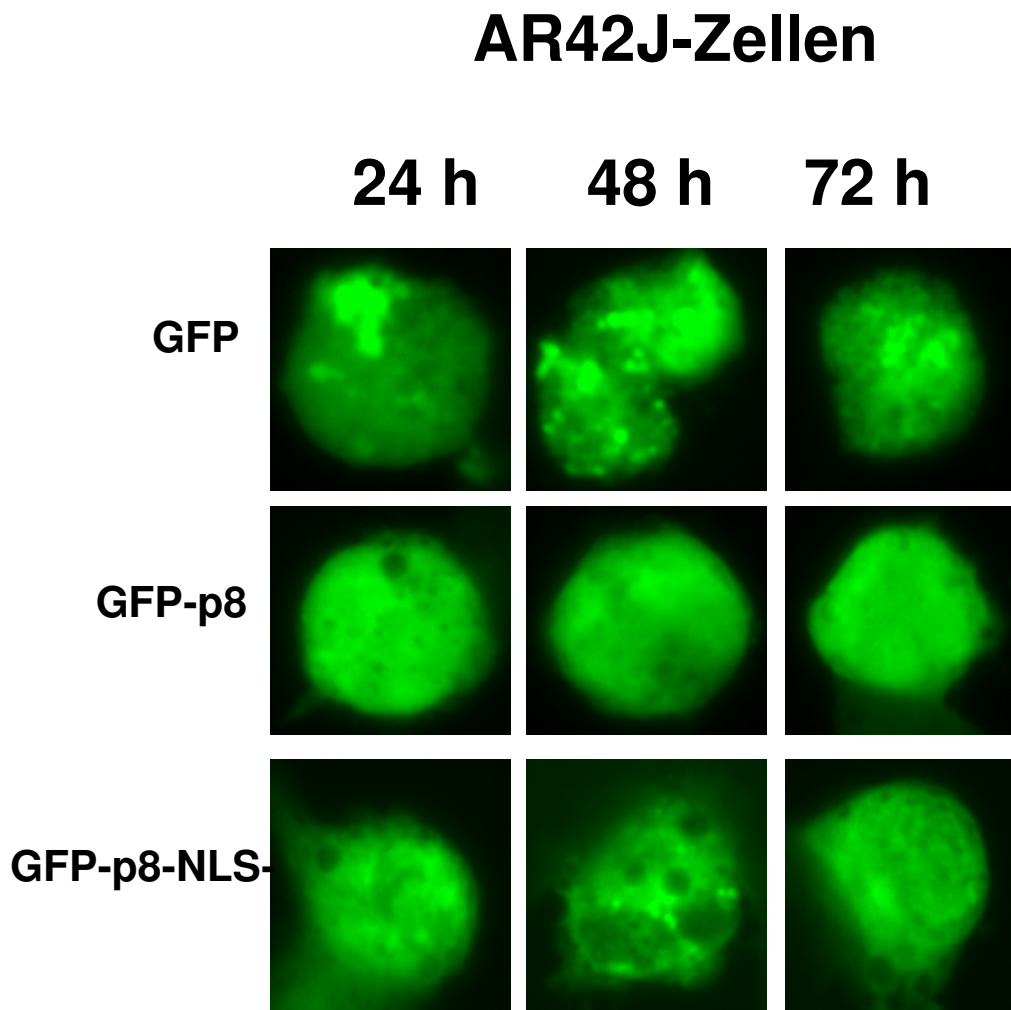


Abb. 4.3.: Subzelluläre Lokalisation von GFP-p8 in AR42J-Zellen: Transiente Transfektion von AR42J-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für GFP, das Fusionsprotein GFP-p8 und das Deletionskonstrukt GFP-p8-NLS- kodierten, und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (*Fluoreszenzmikroskopie*)

Mit dieser Methode wurde die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins GFP-p8 mit der des GFP und der des Deletionskonstruktes GFP-p8-NLS- für die jeweiligen Zelllinien verglichen. In den Cos-7- und INS-1-Zellen war das GFP-p8 überwiegend nukleär lokalisiert, während das GFP und das GFP-p8-NLS- den Zellkern aussparten. Dieses spricht dafür, dass p8 ein nukleäres Protein ist, und dass die deletierte DNA-Sequenz für ein NLS kodiert. Bei den AR42J Zellen waren die Ergebnisse weniger deutlich. Alle drei Proteine waren in diesen Zellen nukleär lokalisiert, es fanden sich lediglich diskrete Unterschiede im Erscheinungsbild. Während das GFP-p8 sich eher homogen im Zellkern befand, war es beim GFP-p8-NLS- und beim GFP eher granulär nukleär lokalisiert.

4.3. Spezifische Expression der transfizierten GFP-p8-Fusionsproteine

Die spezifische Expression der transfizierten GFP-p8-Fusionsplasmide wurde mittels Western-Blot überprüft.

Auf 10-cm-Zellkulturschalen wurden Cos-7-Zellen transfiziert mit den Plasmiden p8pEGFP-c1MG (GFP-p8-Fusionsprotein), p8pEGFP-c1MG-NLS- (GFP-p8-NLS--Deletionskonstrukt) und pEGFP-c.1MG (GFP). Außerdem wurde eine Zellkulturplatte als Kontroll-Platte nur mit Lipofektamin behandelt. Von diesen vier Proben wurden Whole-Cell-Extrakte angefertigt und mittels Western-Blot untersucht.

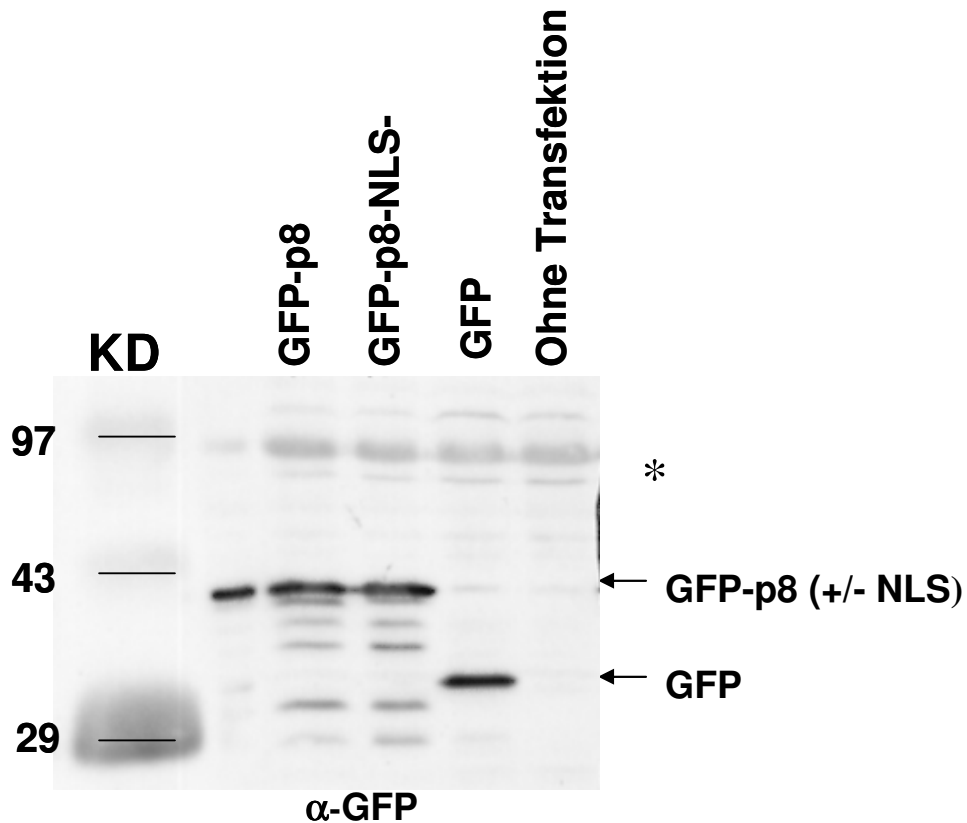


Abb.4.4.: Spezifische Expression der transfizierten GFP-p8-Fusionsproteine: Cos-7 Zellen wurden mit den Plasmiden p8pEGFP-c1MG (GFP-p8), p8pEGFP-c1MG-NLS- (GFP-p8-NLS-) und pEGFP-c1MG (GFP) transfiziert. Auf die 4. Bahn wurde ein Whole-Cell-Extrakt untransfizierter Zellen aufgetragen. * sind nicht-spezifische Banden. (Western-Blot)

Auf den Bahnen GFP-p8 und GFP-p8-NLS- ist bei 40 KD, auf der GFP Bahn bei 33 KD je eine kräftige Bande zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die Proteine GFP-p8 und GFP-p8-NLS- und GFP. Auf der Bahn „ohne Transfektion“ finden sich keine Banden vergleichbarer Größe (Negativkontrolle).

Die dünnen Banden bei 97 KD sind nicht-spezifische Bindungen des Antikörpers. Die dünnen, leichten Banden auf den Bahnen GFP-p8 und GFP-p8-NLS- könnten Fragmente sein, die durch Proteasen-Einwirkung entstanden sind.

Es fällt auf, dass das Deletionskonstrukt GFP-p8-NLS- das gleiche Proteingewicht (ca. 40 KD) wie GFP-p8 hat, obwohl das fehlende NLS 17 Aminosäuren lang ist. Am 3' Ende des NLS befindet sich das Stop-Codon TAG. Dieses wurde beim Erstellen des Deletionskonstruktes mit herausgeschnitten. Somit wurde das Plasmid über die für p8 kodierende Sequenz bis zum Stop-Codon der Multiple-Cloning-Side (MCS) abgelesen. Dieser zusätzlich transkribierte DNA-Abschnitt der MCS hatte zufällig die gleiche Länge wie das herausgeschnittene NLS.

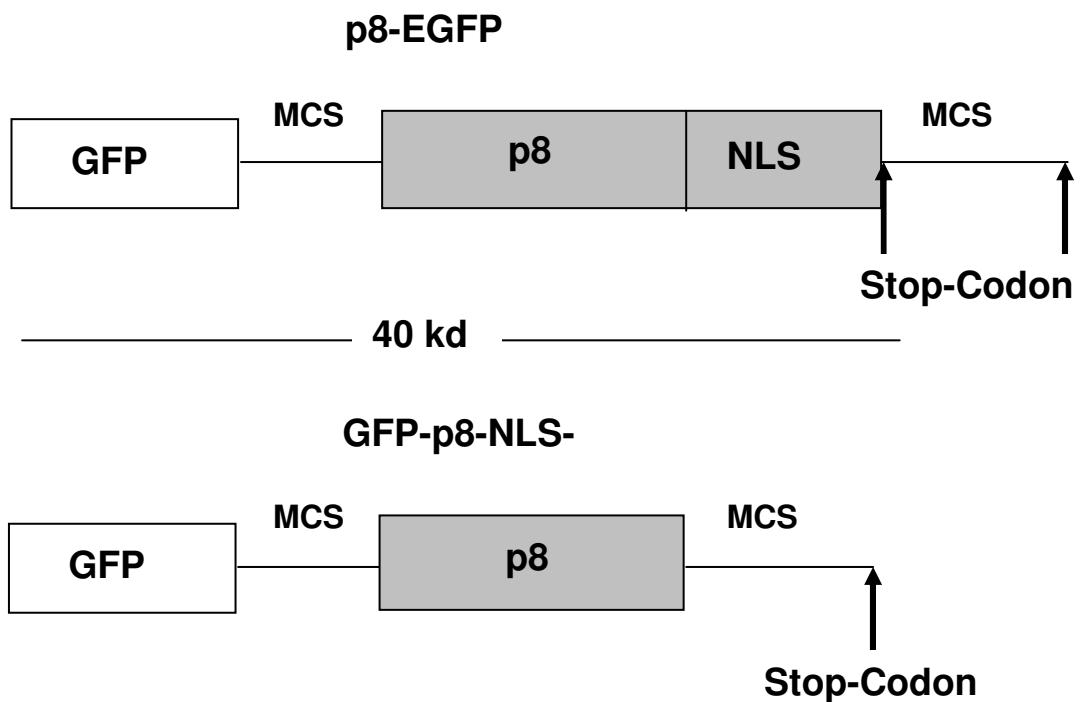


Abb. 4.5.: Proteingröße der Fusionsproteine aus Abb. 4.4.. Das Deletionskonstrukt GFP-p8-NLS- hat das gleiche Gewicht wie das Fusionsprotein GFP-p8. Das Stop-Codon am 5' Ende des NLS wurde beim Klonieren des Deletionskonstruktes mit herausgeschnitten. Die Transkription wurde am 3' Ende der MCS beendet. Der zusätzlich transkribierte DNA-Abschnitt ist zufällig genauso lang wie das deletierte NLS.

4.4. Etablieren stabiler INS-1-Zelllinien mit induzierbarer p8-Überexpression

Um weitere Informationen über die Funktion und Wirkungsweise von p8 zu erhalten, wurden stabile INS-1-Zelllinien etabliert, die nach Stimulation mit IPTG p8 überexprimierten. Für die erste Transfektion wurden drei 10-cm-Zellkulturplatten INS-1-Zellen mit dem linearisierten Plasmid P3´SS transfiziert, welches für den Lac-Repressor kodiert. Hierbei konnte ein Klon expandiert werden. Die spezifische Expression des Lac-Repressors wurde mittels Western-Blot überprüft.

INS-1-Zellen nach 1. stabiler Transfektion

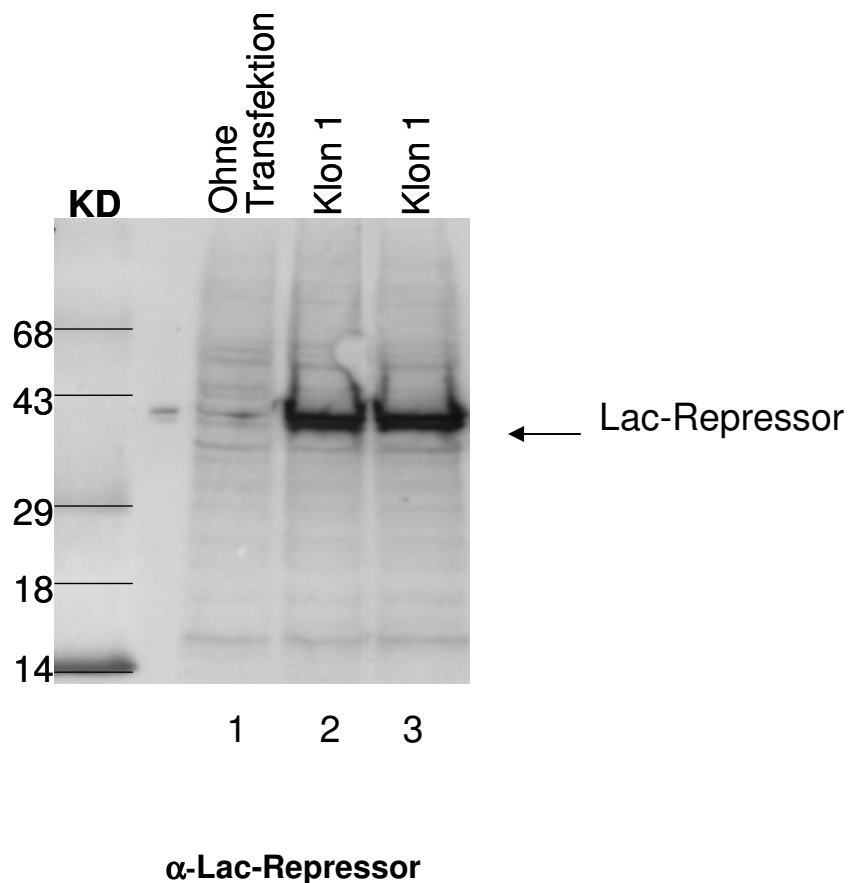


Abb.4.6.: Spezifische Expression des Lac-Repressors von stabil transfizierten INS-1-Zellen. Es wurde ein Lac-Repressor-Antiserum verwendet. Klon 1 der stabil transfizierten Zellen (Bahn 2 und 3) wurden mit nicht transfizierten INS-1-Zellen (Bahn 1) verglichen. (*Western-Blot*)

Es ist eine kräftige Bande von ungefähr 40 KD auf den Bahnen 2 und 3 zu sehen, die auf der Bahn 1 fehlt. Hierbei handelt es sich um die Expression des stabil transfizierten Lac-Repressors.

Für die zweite stabile Transfektion wurden drei 10-cm-Zellkulturschalen dieser stabilen Zellen mit p8-pOPRSV1 transfiziert. Es wurden 25 Klone expandiert. Je nachdem, an welcher Stelle das Plasmid in die Zellkern-DNA integriert wurde, fand man eine unterschiedlich starke Expression von p8. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen kein Antikörper gegen p8 verfügbar war, wurde die Expression mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Es wurde die RNA Expression der einzelnen Klone im stimulierten und im unstimulierten Zustand miteinander verglichen.

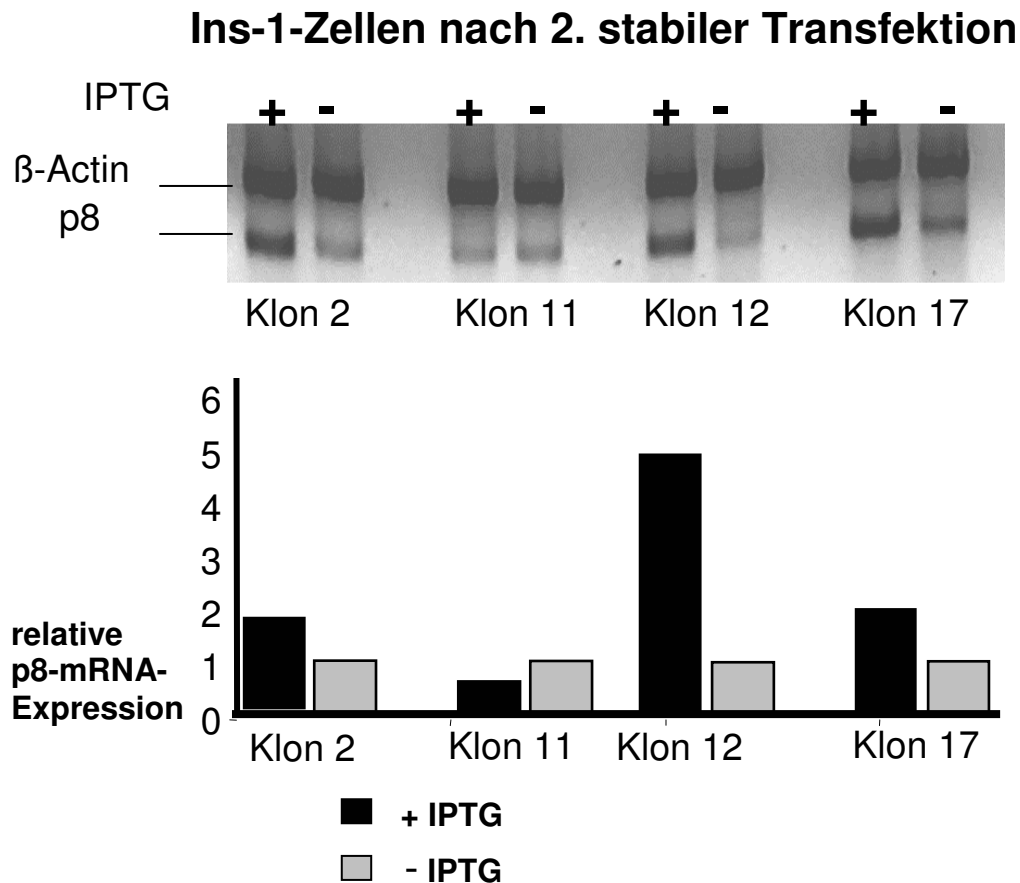


Abb.4.7.: Induzierte p8-mRNA-Expression in INS-1-Zellen:
Vergleich der p8-mRNA Expression in IPTG induzierten und nicht induzierten Klonen der stabilen INS-1-Zellen. (RT-PCR)

Der Klon 12 zeigte eine 5fache Überexpression von p8 im stimulierten Zustand verglichen mit dem nicht-stimulierten Zustand. Für die folgenden Experimente wurde dieser Klon verwendet.

4.5. p8-abhängige Zellproliferation

Eine wichtige Fragestellung unserer Arbeit war, ob INS-1-Zellen als Modell für β -Zellen des endokrinen Pankreas durch p8-Überexpression vermehrt proliferieren. Glukose ist für INS-1-Zellen ein sehr starker Induktor von Zellproliferation. Gleiches gilt für Wachstumsfaktoren, die im FBS-Rinderserum des Zellkulturmediums vorhanden sind (*Untersuchungen von Seufert et al.*). In Arbeiten von *Seufert et al.* konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosespiegel eine vermehrte p8-Expression induzieren, während niedrige Glukosespiegel diese reduzieren. In den durchgeführten Zellzählungsexperimenten sollte das Wachstumsverhalten von INS-1-Zellen mit p8-Überexpression mit dem von INS-1-Zellen ohne p8-Überexpression verglichen werden. Es wurde versucht, die endogene p8-Expression und die endogene Proliferation der INS-1-Zellen möglichst zu reduzieren. Daher wurde sowohl Glukose als auch FBS möglichst weit erniedrigt. INS-1-Zellkulturmedium enthielt 11.1 mM Glukose und 10 % FBS-Medium. Für die durchgeführten Proliferationsversuche wurde 5.6 mM Glukose und 2.8 % FBS-Medium gewählt (Proliferationsversuchsmedium). Das Zellkulturmedium wurde alle 12 Stunden gewechselt. Dem Medium der Zellen, die p8 überexprimieren sollten, wurde 5.5 mM IPTG zugegeben.

In einem ersten Versuch wurden 130000 stabile Zellen in „6well-Zellkulturplatten“ gegeben und, nachdem sie angewachsen waren (ca.10 Stunden später), gezählt (Zeitpunkt 0 h). Es wurden Werte für die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Wachstum der stimulierten und der unstimulierten INS-1-Zellen ermittelt. Pro Zeitpunkt wurden je 4 Zellkulturschalen mit stimulierten und 4 mit unstimulierten stabilen INS-1-Zellen gezählt. Der arithmetische Mittelwert wurde graphisch dargestellt. Zum Zählen wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst

und nach dem Zählen verworfen. Daher waren die ermittelten Ergebnisse unabhängig voneinander. Es wurden insgesamt 42 Zellkulturplatten gezählt.

Zellzahl (x1000) stabiler INS-1-Zellen							
Zeit (h)	n (+p8)	SD (+p8)	+p8	-p8	SD (-p8)	n (-p8)	p
0	-	-	-	112,25	14,7	4	-
24	3	21,3	149	128,25	19,4	4	-
48	4	46,7	203	148,75	21,8	4	-
72	3	67,4	268	198,5	4,4	4	0.05
96	4	38,0	401	306	56,0	4	0.025
120	4	61,7	464,75	393	32,6	4	0.05

Tabelle 4.1.: p8-abhängige Zellproliferation: Vergleich der Zellzahl stabiler INS-1-Zellen mit IPTG-Stimulation (+p8) mit der Zellzahl stabiler INS-1-Zellen ohne IPTG-Stimulation (-p8). SD ist die Standardabweichung, n der Stichprobenumfang. Das Signifikanzniveau p wurde mittels U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) ermittelt. (Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer)

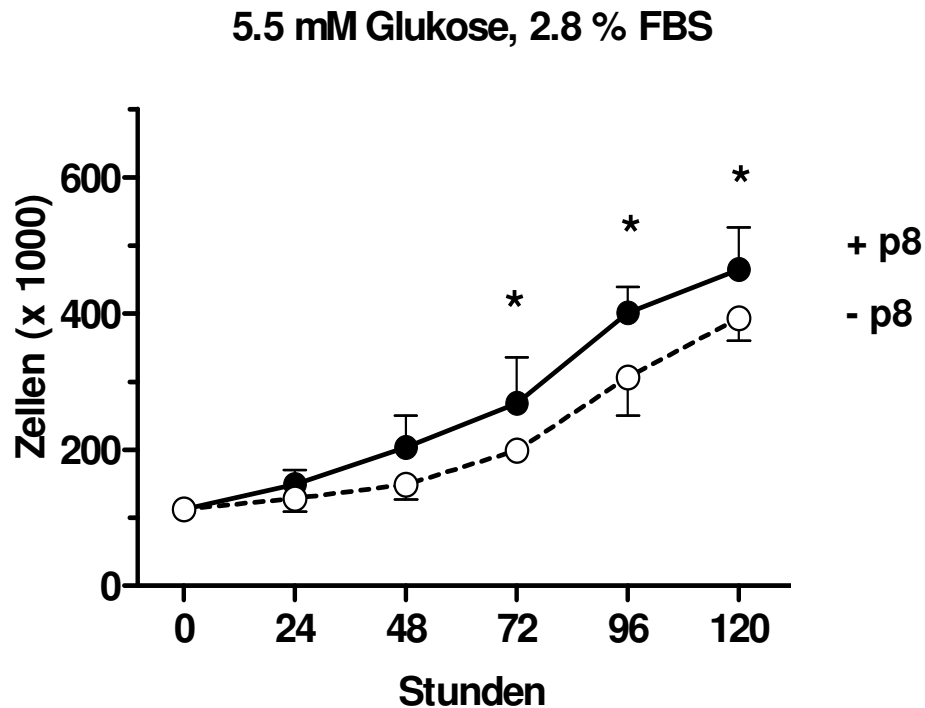


Abb.4.8.: Zellzahl stabiler INS-1-Zellen: Die Zellzahlen der mit IPTG stimulierten stabilen INS-1-Zellen (p8-Überexpression) wurden zeitabhängig verglichen mit den Zellzahlen nicht stimulierter INS-1-Zellen (keine p8-Überexpression). (Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer)

In der Abbildung 4.8. sind für die einzelnen Zeiten die Mittelwerte der gezählten Zellen aufgetragen. Zum Zeitpunkt 0 h wurde ein Mittelwert von 112000 Zellen bestimmt. Dieses ist dadurch zu erklären, dass nicht alle der 130000 ausgesäten Zellen angewachsen waren. Nach 96 Stunden wurde für die unstimulierten Zellen ein Mittelwert von 306000, für die stimulierten von 401000 Zellen errechnet. Der Mittelwert der p8 überexprimierenden Zellen war also nach 96 Stunden um 31 % höher als der der nicht p8 überexprimierenden Zellen. Zum Zeitpunkt 120 Stunden ist ein Abflachen der Wachstumskurve der p8 überexprimierenden Zellen zu beobachten. Dieses ist dadurch zu erklären, dass die Zellen in den „6well-Zellkulturplatten“

zwischen 500000 und 600000 konfluent wurden und das Zellwachstum hierdurch gehemmt wurde.

Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) verwendet (40). Für jeden Zeitpunkt wurden die Zellzahlen der p8 überexprimierenden Zellen mit den Zellzahlen der nicht p8 überexprimierenden Zellen verglichen. Signifikante Unterschiede wurden für die Zeiten 72 h, 96 h und 120 h ermittelt. Die zu vergleichenden Stichproben bestanden aus je 3 bis 4 Elementen.

Zusätzlich wurde der Median-Test mit Vierfelder-Chi-Quadrat-Test und mit Fischer-Yeats-Test verwendet (8). Hierbei wurden die Zellzahlen der p8 überexprimierenden Zellen für die Zeiten 48 h, 72 h, 96 h, 120 h zu einer Gruppe zusammengefasst und mit den Zellzahlen der nicht p8 überexprimierenden Zellen verglichen. Die zu vergleichenden Gruppen bestanden somit aus 15 (mit p8-Überexpression) bzw. 16 (ohne p8-Überexpression) Elementen.

Um die Ergebnisse der verschiedenen Zeiten vergleichbar zu machen, wurde für die Zeitpunkte 48 h, 72 h, 96 h, 120 h je ein eigener Medianwert (Md) bestimmt und je eine Vierfelder-Tafel erstellt. Die Vierfelder-Tafeln für die einzelnen Zeitpunkte wurden addiert.

Die Addition der Vierfelder-Tafeln ergab:

	Mit p8	Ohne p8	Summe
Größer Md	13	2	15
Kleiner Md	2	13	15
Summe	15	15	30

Damit ergab der *Vierfelder-Chi-Quadrat-Test* :

a=13, b=2, c=2, d=13, N=30

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \frac{N \times (ad - bc)^2}{(a+b) \times (c+d) \times (a+c) \times (b+d)} \\ &= \frac{30 \times (169 - 4)^2}{15 \times 15 \times 15 \times 15} \\ &= 16.1\end{aligned}$$

Nach Tafel B (8) entsprach dieses Ergebnis dem Signifikanzniveau $p=0.005$

Diese Aussage wurde mit dem *Fischer-Yates-Test* überprüft:

$$\begin{aligned}P &= \frac{15! \times 15! \times 15! \times 15!}{30! \times 13! \times 13! \times 2! \times 2!} + \frac{15! \times 15! \times 15! \times 15!}{30! \times 14! \times 14! \times 1! \times 1!} + \frac{15! \times 15! \times 15! \times 15!}{30! \times 15! \times 15! \times 0! \times 0!} \\ &= 7.1 \times 10^{-5} + 1.45 \times 10^{-6} + 6.45 \times 10^{-9} \\ &= 7.2 \times 10^{-5} \\ &= 0.00007\end{aligned}$$

Mit beiden Tests ist somit die Annahme der Alternativhypothese H_1 höchst signifikant ($p=0.005$). Die p8 überexprimierenden Zellen stammen also aus einer Population mit höherem Median als die nicht p8 überexprimierenden Zellen.

Im folgenden Versuch wurden Zellzahlen in Abhängigkeit von der p8-Überexpressionszeit ermittelt. Es wurden 180000 Zellen in „6-well Zellkulturplatten“ ausgesät. Sämtliche Zellen wuchsen 96 Stunden (Wachstumszeit) und wurden während dieser Zeit unterschiedlich lange mit IPTG stimuliert, so dass p8 unterschiedlich lange überexprimiert wurde (p8-Überexpressionszeit). Die angegebenen p8-Überexpressionszeiten beziehen sich auf die Zeitspanne bis zum Auszählen. Somit wurden die Zellen mit 0 Stunden p8-Überexpressionszeit gar nicht, die mit 96 Stunden p8-Überexpressionszeit während der gesamten Wachstumszeit mit IPTG stimuliert. Die Zellen mit 24, 48 oder 72 Stunden p8-Überexpressionszeit

wurden die letzten 24, 48 oder 72 Stunden vor dem Auszählen mit IPTG stimuliert. Pro Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h p8-Überexpressionszeit) wurden INS-1-Zellen aus vier verschiedenen Zellkulturschalen gezählt.

Zeit	Mittelwert	n	SD	p (gegen 0h)
0h	433,5	4	70.02	-
24h	469,75	4	66.74	-
48h	563,75	4	59.49	0.05
72h	599,75	4	16.96	0.001
96h	596,75	4	40.97	0.001

Tabelle 4.3.: Zellzahl in Abhängigkeit von der p8-Überexpressionszeit. Die in die Tabelle eingetragenen Zeiten sind Stimulationszeiten mit IPTG (entspricht der p8-Überexpressionszeit). Die Wachstumszeit betrug für alle Zellen 96 h. Mittels ANOVA und Dunnett's-Test wurden die für 0 h p8-Überexpressionszeit ermittelten Zellzahlen mit den Zellzahlen für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h p8-Überexpressionszeit verglichen. SD ist die Standardabweichung, n der Stichprobenumfang. (*Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer*)

Die in der Tabelle angegebene Zeit ist die Stimulationszeit mit IPTG (entspricht der p8-Überexpressionszeit). Die Wachstumszeit betrug für alle Zählungen 96 Stunden. Die Zellzahlen sind mit 1000 zu multiplizieren.

Die Zellzahlen der einzelnen Stimulationszeiten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiedlichkeit überprüft. Die Alternativhypothese H_1 wurde mit $p=0.005$ angenommen. Der Mittelwert für mindestens einen Zeitpunkt unterscheidet sich folglich von den Mittelwerten der anderen Zeitpunkte. Mit Dunnett's-Test wurden anschließend die für die Zeitpunkte 24 h, 48 h, 72 h, 96 h ermittelten Zellzahlen mit den für 0 h ermittelten Zellzahlen verglichen (37).

Die Mittelwerte für die Zeitpunkte 48 h, 72 h und 96 h p8-Überexpressionszeit unterschieden sich signifikant von dem Mittelwert für 0 h p8-Überexpressionszeit.

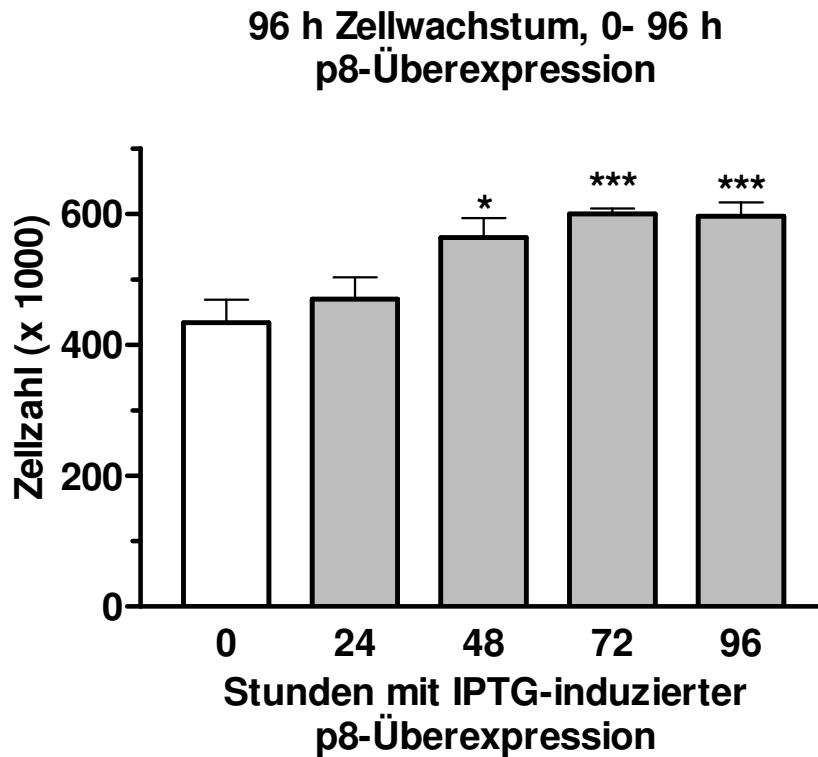


Abb. 4.9.: Zellzahl in Abhängigkeit von der p8-Überexpressionszeit: Es wurden 180000 Zellen ausgesät (Wachstumszeit 0 h), die Zellzählungen wurden nach 96 h durchgeführt. (Zellzählungen mit Neubauer-Zählkammer)

Je nachdem wie lange die Zellen mit IPTG stimuliert wurden (und somit p8 überexprimiert wurde), zeigten die Zellen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Der Mittelwert der Zellen, die die ganze Zeit p8 überexprimierten (96 h p8-Überexpressionszeit, 96 h Wachstumszeit), betrug 596000, der der nicht stimulierten Zellen (0 h p8-Überexpressionszeit, 96 h Wachstumszeit) 433000. Damit war der Mittelwert der p8 überexprimierenden Zellen um 37 % höher als der Mittelwert der nicht P8 überexprimierenden. Wie im vorhergehenden Experiment war auch hier der Einfluss der Konfluenz (bei 500000-600000 Zellen) auf das Wachstumsverhalten zu beobachten. Der Verlauf beider Graphen (Abb.4.8. und 4.9.) unterliegt dem Einfluss von p8 und zeigt ein Konfluenz-bedingtes Sättigungsverhalten.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Subzelluläre Lokalisation des Proteins p8

Die von uns durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass p8 ein nukleäres Protein ist. Diese These wird durch bereits von *Iovanna et al.* und *Asashima et al.* publizierte Arbeiten untermauert. In Cos-7-Zellen überexprimiertes hump8 wurde mit Antikörperfärbungen fast ausschließlich nukleär gefunden (64). Xp8 wurde in *Xenopus-Laewis* durch Erstellen eines GFP-Fusionsproteins ebenfalls nukleär lokalisiert (25). Mit dem von uns gewählten Versuchsansatz konnte allerdings für die Ar42J-Zellen trotz mehrmaligen Wiederholens der Experimente eine nukleäre Lokalisation weder bewiesen noch widerlegt werden. In diesen Zellen fanden wir alle drei Proteine GFP-p8, GFP, GFP-p8-NLS- vorwiegend nukleär lokalisiert. Vom Hersteller (*Clontech*) wird aber GFP als Protein beschrieben, dass sich granulär im Zytoplasma befindet. Es kann also angenommen werden, dass es in den AR42J-Zellen passiv zu einem Einstrom von GFP in den Zellkern kam. Möglicherweise sind diese Zellen empfindlicher als Cos-7- und INS-1-Zellen. Es ist denkbar, dass es während der Analyse der Zellen zu einer Schädigung der Kernmembran der AR42J-Zellen mit Einstrom des GFP in den Nukleus kam.

Die Existenz eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) wurde mittels Deletionskonstrukt des Fusionsproteins GFP-p8 untersucht. Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass p8 ein C-terminal lokalisiertes NLS besitzt. Als Positivkontrolle hätte zusätzlich ein Konstrukt GFP-NLS erstellt werden müssen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass ein weiteres NLS für den Transport von p8 in den Zellkern benötigt wird. Außerdem kann anhand der durchgeführten Versuche nicht geklärt werden, ob das NLS exakt oder unvollständig deletiert wurde.

Die Wirkungsweise, mögliche Interaktionspartner und Protein-Gruppen-Zugehörigkeit von p8 sind unbekannt. Die Kenntnis der nukleären Lokalisation und Existenz eines NLS grenzt die Möglichkeiten hierfür ein. Homologien scheinen zu der Gruppe der Homeodomain-Transkriptionsfaktoren (33) und den HMG-1/Y (18) zu bestehen, die aber nicht signifikant sind. Gegen die Zugehörigkeit zu den Homeodomain-Transkriptionsfaktoren spricht z.B., dass rp8 mit einer Länge von 80

Aminosäuren (hump8 mit 82 Aminosäuren) sehr klein ist. Die meisten Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe sind um das 2-3fache größer: PDX-1 hat beispielsweise 283, Hox-1 270 und GBx-2 348 Aminosäuren (*siehe Datenbank*).

5.2. Einfluss des Proteins p8 auf das Zellwachstum von β -Zellen des endokrinen Pankreas

Zu Beginn dieser Arbeit war die Hypothese aufgestellt worden, dass p8 eine wichtige Rolle im Proliferationsverhalten von β -Zellen des endokrinen Pankreas spielt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden induzierbar stabile INS-1-Zellen etabliert und Zellzählungen durchgeführt.

5.2.1. stabile INS-1-Zellen mit induzierbarer p8-Überexpression

Es wurde das Lac-Switch-System[®] verwendet, welches zwei nacheinander durchgeführte stabile Transfektionen erforderte. Ein induzierbares System wurde gewählt, um während des Expandierens der transfizierten Zellen potentielle toxische Effekte des überexpimierten Proteins (p8) auf die Zellen zu vermindern.

Während der Zeit des Erstellens der Zellen (insgesamt ca. 7 Monate) enthielt das Zellkulturmedium zytotoxische Antibiotika (Hygromyzin und/ oder G418[®]). Es ist daher nicht vollständig auszuschließen, dass sich der Phänotyp der stabil transfizierten Zellen von dem der Ursprungszellen unterscheidet. In von *Seufert et al.* durchgeführten Experimenten konnte jedoch eine mit den ursprünglichen INS-1-Zellen vergleichbare Insulin-Sekretion und Genexpression (z.B. PDX-1) nachgewiesen werden.

Für den Klon 12 wurde eine 5fache Überexpression von p8-mRNA durch Stimulation mit IPTG erzielt. Dieses ist im Vergleich zu anderen Vektor-Konstrukten zur Erstellung von stabilen Zellen (z.B. das TET on/off System) vergleichsweise gering (20, 30). Im Idealfall besteht die p8-Expression der nicht stimulierten Zellen nur aus endogenem p8. Es kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass auch im nicht stimulierten Zustand partiell das transfizierte Gen exprimiert wird.

5.2.2. Zellzählungsexperimente

In zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurde zeitabhängig jeweils die Zellzahl p8 überexprimierender Zellen mit der Zellzahl p8 nicht überexprimierender Zellen verglichen. Hierbei wurde in beiden Experimenten unter p8-Überexpression eine erhöhte Zellzahl ermittelt: Im 1. Versuch nach 96 Stunden 31 %, im 2. Versuch nach 96 Stunden 37 % mehr Zellen. Die beiden Experimente waren anders aufgebaut, daher sind die Absolut- und Prozentwerte nicht miteinander zu vergleichen.

In beiden Experimenten betrug pro Zeitpunkt der Stichprobenumfang der zu vergleichenden Stichproben je 3 bis 4. Der Stichprobenumfang war somit zu gering, um eine Normalverteilung nachzuweisen. Daher wurden nichtparametrische Tests verwendet (U-Test, Median-Test, Vierfelder-Chi-Quadrat-Test, Fischer-Yeats-Test und nichtparametrischer ANOVA)

Für den Median-Test mit Vierfelder-Chi-Quadrat-Test und mit Fischer-Yeats-Test wurden mehrere Stichproben zu einer Gruppe zusammengefasst. Die zu vergleichenden Gruppen bestanden aus 15 (mit p8-Überexpression) bzw. 16 (ohne p8-Überexpression) Elementen. Daher sind die mit diesen Tests ermittelten Ergebnisse zuverlässiger als die des U-Tests.

Die unter p8-Einfluß ermittelten erhöhten Zellzahlen lassen den Schluss zu, dass p8-Überexpression in INS-1-Zellen Proliferation induziert. Es ist zu bedenken, dass nur eine 5fache Überexpression von p8 für diese Ergebnisse verantwortlich war. *Iovanna et al.* beschreiben für Cos-7-Zellen unter p8-Überexpression ein massives Zellwachstum (ca. 100 % mehr Zellen nach 4 Tagen), für AR42J-Zellen ca. 40 - 50 % mehr Zellen nach 4 Tagen (33). AR42J-Zellen können als Zellmodell für duktales Vorläuferzellen des Pankreas angesehen werden (34, 35, 67). Daher kann man mutmaßen, dass der Differenzierungsgrad der AR42J-Zellen geringer und die Fähigkeit zur Proliferation größer ist als die der INS-1-Zellen. Vor diesem Hintergrund sind die in dieser Arbeit erhobenen Zellzahlen der INS-1-Zellen mit den AR42J-Zellzahlen (33) kompatibel.

Die in unserer Arbeit ermittelte, vergleichsweise „milde“ Zellproliferation mit 31 % und 37 % mehr Zellen nach 96 Stunden unter p8-Überexpression könnte ein Indiz

sein, dass p8-Überexpression nicht zu einem Differenzierungsverlust der INS-1-Zellen führt.

5.2.3. Insulin-Sekretion der stabilen INS-1-Zellen

Von *Seufert et al.* wurden die Insulin-Sekretion und die Proinsulin-mRNA-Expression der stabilen INS-1-Zellen in Abhängigkeit von p8-Überexpression untersucht. Unter p8 Einfluss wurde nach 96 Stunden mittels ELISA eine erhöhte kumulative Insulinsekretion ermittelt. Die Insulin-mRNA-Expression war unverändert. Daher scheint die Insulinsekretion der einzelnen INS-1-Zellen unter p8-Einfluss kaum verändert, wohl aber die Menge der Zellen. Die erhöhte Insulinsekretion beruht daher mutmaßlich auf der erhöhten Zahl Insulin produzierender Zellen.

Die unveränderte Insulin-mRNA-Expression der p8-überexprimierenden Zellen ist ein weiterer Hinweis, dass p8-Überexpression in dem Zeitraum von 96 h keinen Differenzierungsverlust der INS-1-Zellen bewirkt.

Da die Insulinsekretions-Messungen unabhängig von den in dieser Arbeit durchgeführten Zellzählungsexperimenten waren, ist es nicht möglich, die durchschnittliche Insulinsekretion der Einzelzellen zu errechnen.

5.3. Funktion und potentielle therapeutische Nutzung des Proteins p8

Die Anzahl der β -Zellen des menschlichen Körpers wird durch eine Reihe von Mediatoren der jeweiligen Stoffwechsellage angepasst (2, 3, 6, 12). p8 könnte ein solcher Mediator sein. Eine Nutzung von p8 zur Induktion von β -Zellproliferation im Rahmen innovativer Therapieansätze des Diabetes mellitus erscheint denkbar.

Bereits einleitend war auf den Mangel an Spenderorganen für Inseltransplantationen und das große Interesse an alternativen Quellen für β -Zell-Ersatztherapien hingewiesen worden. Viele dieser alternativen Quellen weisen gravierende Nachteile auf. Versuche mit embryonalen Stammzellen zeigten im Tierexperiment erfolgsversprechende Ergebnisse (1, 7, 32, 56). Jedoch ist die Verwendung humaner

embryonaler Stammzellen ethisch umstritten. Xenotransplantationen, z. B. die Transplantation von porcinen β -Zellen, sind immunologisch bedenklich und können zu retroviralen Infektionen führen (14, 15, 39, 57).

Vor diesem Hintergrund erscheint der therapeutische Einsatz adulter Stammzellen sinnvoll. Denkbar ist die Isolierung und Amplifizierung duktaler und intrainsulärer Nestin-positiver Stammzellen (28, 29, 50 68,). Hierfür müssten Faktoren eingesetzt werden, die Proliferation induzieren, nicht aber karzinogen sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass p8-Überexpression in einem β -Zell-Modell Proliferation induziert. Während des (kurzen) Zeitraums von 96 Stunden wurden keine Hinweise für Differenzierungsverlust der Zellen vorgefunden. Im Zellmodell für duktale Vorläuferzellen (AR42J) induziert p8 ebenfalls Proliferation (33).

Eine Expansion Nestin-positiver Stammzellen durch kontrollierte p8-Überexpression erscheint denkbar. Nestin ist ein Intermediärfilament, das als Marker für neuronale und pankreatische Stammzellen gilt (28 29, 50 68,). Es wird in differenzierten Zellen nicht mehr exprimiert (66). p8 könnte in einem Nestin-spezifischen Vektor in die Stammzellen transfiziert werden, der durch den Phänotypwechsel zur differenzierten β -Zelle deaktiviert wird.

Erhöhte p8-Expression wurde im Zusammenhang mit Pankreas- und Mamakarzinomen beobachtet (9, 42, 58, 59, 62). Hierbei ist die Funktion dieses nahezu ubiquitär vorhandenen Proteins jedoch völlig unklar. Einige der erwähnten Arbeiten sehen p8-Expression als Voraussetzung für das Etablieren von Tumoren und schreiben ihm eine antiapoptotische Funktion zu (58, 59, 62). In anderen Arbeiten wurde p8 als Mediator für Inhibition des Zellwachstums von Karzinomen beschrieben (9, 61).

Wir denken, dass p8 als Proliferation-assoziiertes Protein unspezifisch im Rahmen von erhöhtem Zellwachstum auch bei Malignomen vermehrt exprimiert wird, ohne mit der Tumor-Neogenese in kausalem Zusammenhang zu stehen.

5.4. Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zu dem Protein p8 in β -Zellen des endokrinen Pankreas durchgeführt. Ob p8 für neue innovative Therapieformen des Diabetes mellitus geeignet ist, kann hier nicht beantwortet werden.

Bislang ist zu wenig über potentielle Interaktionspartner und Wirkung von p8 bekannt. Es wird in vivo und in vitro gezeigt werden müssen, dass p8-Expression keine Tumor-Induktion bewirkt.

Weitere Untersuchungen zu diesem bislang wenig charakterisierten Protein erscheinen uns auch für den Fall, dass keine therapeutische Nutzung stattfindet, sehr sinnvoll. Erkenntnisse über p8 könnten helfen, mehr über das komplexe Zusammenspiel von Molekülen, die Proliferation und Differenzierung der β -Zellen des endokrinen Pankreas steuern, zu verstehen.

6. Zusammenfassung

p8 ist ein vor einigen Jahren erstmals im Zusammenhang mit Pankreatitis beschriebenes 80 Aminosäuren langes Protein, das im exokrinen Pankreas mit vermehrtem Zellwachstum assoziiert ist. Wir konnten p8 auch in β -Zellen des endokrinen Pankreas nachweisen. Um Informationen über die subzelluläre Lokalisation zu erhalten, wurde ein Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus p8 und GFP (grün fluoreszierendes Protein) kodiert, kloniert und in verschiedene Zelllinien transfiziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen dafür, dass p8 ein nukleäres Protein ist. Durch ein Deletionskonstrukt des Fusionsproteins wurde ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) am C-terminalen Ende des Proteins identifiziert.

Um weitere Informationen über Funktion und Wirkungsweise von p8 zu erhalten, wurden induzierbar stabile INS-1-Zellen (β -Zelllinie) etabliert. Stimulation dieser Zellen mit IPTG führte zu einer 5fachen Überexpression von p8. Die Zellzahl der p8-überexprimierenden Zellen und die der nicht-p8-überexprimierenden Zellen wurde zeitabhängig verglichen. Je nach Versuchsaufbau wurden nach 96 Stunden Zellwachstum unter p8-Überexpression 31% bis 37% mehr Zellen als in dem Vergleichskollektiv ohne p8-Überexpression ermittelt. Von *Seufert et al.* wurden in den Zellmedien der p8 überexprimierenden stabilen INS-1-Zellen kumulativ erhöhte Insulin-Spiegel gemessen.

Dieses spricht dafür, dass Überexpression von p8 in β -Zellen Proliferation auslöst, nicht aber zu einem Differenzierungsverlust führt.

Unsere Untersuchungen nähren die Hoffnung, dass in Zukunft mit Hilfe von p8 Spender- β -Zellen in vitro vermehrt und im Rahmen einer Zelltherapie einem Diabetiker transplantiert werden könnten.

7. Literatur

- 1) Assady, S., G. Maor, M. Amit, J. Itzkovitz-Eldor, K. L. Skorecki, M. Tzukerman: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001 Aug.; 50 (8):1691-1697
- 2) Bonner-Weir, S.: Islet growth and development in adult. *J. Mol. Endocrinol.* 2000 Jun.; 24 (3): 297-302
- 3) Bonner-Weir, S.: Life and death of pancreatic β -cells. *Trends Endocrinol. Metabol.* 2000; 11: 375-377
- 4) Bonner-Weir, S., M. Taneja, G.C. Weir, K. Tatarkiewicz, K.-H. Song, A. Sharma, J.J. O'Neil: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *PNAS* 2000 July; 97 (14): 7999-8004
- 5) Bonner-Weir, S.: Pancreatic stem cells. *J. Pathol.* 2002 Jul.; 197 (4): 519-26
- 6) Bonner-Weir, S.: Perspective: Postnatal pancreatic β -cell growth. *Endocrinology* 2000; 141 (6): 1926-1928
- 7) Bonner-Weir, S.: Stem cells in diabetes: what has been achieved. *Horm. Res.* 2003; 60 Suppl. 3: 10
- 8) Bortz, J., G.A. Lienert: Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung. *Springer Verlag* 1998
- 9) Bratland, A., K. Risberg, G.M. Maelandsmo, K.B. Gützkow, O.E. Olsen, A. Moghaddam, M.-Y. Wang, C.M. Hansen, H.K. Blomhoff, J.P. Berg, O. Fodstand, A.H. Ree: Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in breast cancer cells. *Cancer Research*, 2000 October; 60: 5578-5583
- 10) Bretzel, R.G., M. Brendel, M. Eckhard, D. Brandhorst, C. Jäger, E. Hatziagelaki, K. Federin: Islet transplantation: Present clinical situation and future aspects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2001; 109 (2): 384-399
- 11) Calafiore, R.: Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. *Diabetes Care* 1997; 20 (5): 889-894
- 12) Corbett, J., P. Serup, S. Bonner-Weir, J. H. Nielsen: Beta-cell ontogeny: growth and death. *Diabetologia* 1997; 40: B27-B3
- 13) Cretin N, Buhler L, Fournier B et al.: Human islet allotransplantation: world experience and current status. *Dig Surg* 1998; 15: 656-662
- 14) Day, Y., T.D. Vaught, J. Boone, S.H. Chen, C.J. Phelps, S. Ball, J.A. Monahan, P.M. Jobst, K.J. McCreath, A.E. Lamborn, J.L. Cowell-Lucero, K.D. Wells, A.

Colman, I.A. Polejaeva, D.L. Ayares: Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 2002 Mar.; 20 (3): 251-255

15) Deng, Y.M., B.E. Tuch, W.D. Rawlinson: Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 2000 Oct. 70 (7): 1010-1016

16) Edlund, H.: Pancreas: how to get there from the gut? *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999 Dec.; 11 (6): 663-668

17) Edlund, H.: Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998 Dec.; 47 (12):1817- 1823

18) Encinar, J.A., G.V. Mallo, C. Mizyrycki, L. Giono, J.M. González-Ros, M. Rico, E. Cánepa, S. Moreno, J.L. Neira, J.L. Iovanna: Human p8 is a HMG-1/Y- like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. *J. Biol Chem.* 2001; 276 (4) :2742-2751

19) Federin, K.F., H. Jahr, R.G. Bretzel: Islet transplantation as treatment of type 1 diabetes: from experimental beginning to clinical application. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2001; 109 (2): 373-383

20) Fender, P., L. Jeanson, M.A. Ivanov, P. Colin, J. Mallet, J.F. Dedieu, Latta-Mahieu: Controlled transgene expression by E1-E4-defective adenovirus vectors harbouring a "TET-on" switch -system. *J. Gene Med.* 2002 Nov.-Dec.; 4 (6):668- 675

21) Ferber, S.: Can we create new organs from our own tissues? *Isr. Med. Assoc. J.* 2000 Jul.; 2 Suppl.:32-36

22) Gracia-Montero, A., S. Vasseur, G.V. Mallo, P. Soubeyran, J.-C. Dagorn, J.L. Iovanna: Expression of the stress-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change. *Eur. J. Cell Biol.* 2001 Nov; 80 (11): 720- 725

23) Hayek, A., G.M. Beattie, V. Chirulli, A.D. Lopez, C. Ricordi, J.S. Rubin: Growth factor/ matrix- induced proliferation of human adult β -cells. *Diabetes* 1995 Dec.; 44: 1458-1460

24) Hunziker, E. and M. Stein: Nestin- expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2000 Apr.; 271 (1): 116- 119

25) Igrashi, T., H. Kuroda, S. Takahashi, M. Asashima: Cloning and characterisation of the *Xenopus laevis* p8 gen. *Develop. Growth Differ.* 2001; 43: 693- 698

26) Jiang, Y.F., M.I. Vaccaro, F. Fiedler, E.L. Calvo, J.L. Iovanna: Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 260: 686-690

-
- 27) Lakey, J.R., P.W. Burridge, A.M. Shapiro: Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl. Int.* 2003 Sep.; 16 (9): 613-32. *Epup* 2003 Aug. 19.
- 28) Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF: Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 670–674
- 29) Lendahl, U., L.B. Zimmerman, R.D. McKay: CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990 Feb.; 60 (4): 585-595
- 30) Levandowski, M.: Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2001 Oct.; 2 (10): 743-755
- 31) Liu, E.H., K.C. Herold: Transplantation of the islets of Langerhans: new hope for treatment of type-1 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11 (9): 379-382
- 32) Lumelski, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin, R. McKay: Differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting structures similar to islets. *Science* 2001 May; 292(5520): 1389- 1394
- 33) Mallo, G.V., F. Fiedler, E.L. Calvo, E.M. Ortiz, S. Vasseur, V. Keim, J. Morisset, J.L. Iovanna: Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32360-32369
- 34) Mashima, H., C. Yamada, T. Tajima, M. Seno, H. Yamada, J. Takeda, L. Kojima: Genes expressed during the differentiation of pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 1999; 48: 304-309
- 35) Mashima, H., H. Ohnishi, K. Wakabayashi, T. Mine, J. Miyagawa, T. Hanafusa, M. Seno, H. Yamada, L. Kojima: Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin secreting cells. *J.Clin. Invest.* 1996 Apr. 1; 97 (7): 1647-54
- 36) Motoo, Y., J.L. Iovanna, G.V. Mallo, S.-B. Su, M.J. Xie, N. Swabu: p8 expression is induced in acinar cells during chronic pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2001 Aug; 46 (8): 1640-1646
- 37) Motulski, H.: *Intuitive Biostatistics.* Oxford University Press 1995
- 38) Nácher, V., M. Raurell, J.F. Merino, O. Aranda, J. Solner, E. Montana: β -cell growth and mass are preserved in long-term syngeneic islet-transplantation in streptozocin-induced diabetic Lewis Rats. *Diabetes* 1996; 45: 1541-1546

- 39)** Patience, C., Y. Takeuchi, R. A. Weiss: Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 1997 Mar.; 3 (3): 282-286
- 40)** Precht, M.: Bio-Statistik, Eine Einführung für Studierende der biologischen Wissenschaften. R. Oldenburg Verlag München Wien, 1987
- 41)** Ramiya, V.K., M. Maraist, K.E. Arfors, D.A. Schatz, A.B. Peck, J.G. Cornelius: Reversal of insulin- dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 2000 Mar.; 6 (3): 278-282
- 42)** Ree, A. H., M.M. Pacheco, M. Tvermyr, O. Fodstad, M.M. Brentani: Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2000 May; Vol. 6: 1778- 1783
- 43)** Robertson, R.P., C. Davis, J. Larsen, R. Stratta, and D.E. Sutherland: Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 2000 Jan.; 23 (1): 112-116
- 44)** Ryan, E.A., J.R. Lakey, B.W. Paty, S. Imes, G.S. Korbitt, N.M. Knetman, D. Bigam, R.V. Rajotte, A.M. Shapiro: Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002 Jul.; 51 (7): 2148-2157
- 45)** Ryan, E.A., J.R. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Knetemann, G.L. Warnock, I. Larsen, A.M. Shapiro: Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protokol. *Diabetes* 2001 Apr.; 50 (4): 710-9
- 46)** Sachs, D.H. and S. Bonner-Weir: New islets from old. *Nat. Med.* 2000 Mar.; 6 (3): 250-251
- 47)** Sambrook, J., D.W. Russel: Molecular Cloning, a laboratory manual. 3rd edition; Cold spring harbour, New York, USA
- 48)** Schettler, G., H. Greten: Innere Medizin. Thieme Verlag 9. Auflage, 1998
- 49)** Schmied, B.M., G. Liu, H. Matsuzaki, A. Ulrich, S. Hernberg, M.P. Moyer, L. Weide, L. Murphy, S.K. Batra, P.M. Pour: Differentiation of islet cells in long-term culture. *Pancreas* 2000 May.; 20 (4.): 337-347
- 50)** Selander, L., H. Edlund: Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech. Dev.* 2002 May; 113 (2): 189-192
- 51)** Serup, P., O.D. Madsen, T. Mandrup-Poulsen: Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ* 2001; 322: 29-32
- 52)** Serup, P.: Panning for pancreatic stem cells. *Nat. Genet.* 2000 Jun.; 25 (2): 134-135

- 53) Shapiro, A. M., E. A. Ryan, J. R. Lakey: Diabetes. Islet transplantation. *Lancet* 2001 Dec.; 358.:21
- 54) Shapiro, A.M., E. Geng Hao, J.R. Lakey, D.T. Finegood, R.V. Rajotte, N.M. Kneteman: Defining optimal immunosuppression for islet transplantation based on reduced diabetogenicity in canine islet autografts. *Transplantation* 2002 Dec.; 15; 74 (11): 1522-8.
- 55) Shapiro, A.M., J.R. Lakey, E.A. Ryan, G.S. Korbutt, E. Toth, G.L. Warnock, N.M. Kneteman, R.V. Rajotte: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus, using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 2000 Jul. 27; 343(4): 230-238
- 56) Soria, B., E Roche, G. Berna, T. Leon- Quinto, J.A. Reig, F. Martin: Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin- induced diabetic mice. *Diabetes* 2000 Feb.; 49 (2): 157-162
- 57) Stoye, J.P., P. Le Tissier, Y. Takeuchi, C. Patience, R.A. Weiss: Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation? *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1998 Dec.; 862: 67-74
- 58) Su, S.-B., Y. Motoo, J.L. Iovanna, P. Berthézène, M.-J. Xie, H. Mouri, K. Ohtsubo, F. Matsubara, N. Sawabu: Overexpression of p8 is correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 2001 May; Vol. 7: 1320- 1324
- 59) Su, S.-B., Y. Motoo, J. L. Iovanna, M.-J. Xie, H. Mouri, K. Ohtsubo, Y. Yamaguchi, H. Watanabe, T. Okai, F. Matsubara, N. Sawabu: Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 2001 February; Vol. 7: 309- 313
- 60) Su, S.-B. Y. Motoo, J.L. Iovanna, M.J. Xie, N. Sawabu: Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis-associated-protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001 Aug.; 23 (2): 134-140
- 61) Vasseur, S., A. Hoffmeister, A. Gracia-Montero, G.V. Mallo, R. Feil, S. Kuhbander, J.-C. Dagorn, J.L. Iovanna: p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis. *Oncogene* 2002 Mar; 21 (11): 1685-1694
- 62) Vasseur, S., A. Hoffmeister, S. Gracia, C. Bagnis, J.-C. Dagorn, J.L. Iovanna: p8 is critical for tumor development induced by ras^{V12} mutated protein and E1A oncogene. *EMBO reports* 2002; vol. 31, no. 21: 165- 170
- 63) Vasseur, S., G.V. Mallo, A. Garcia-Montero, E.M. Ortiz, F. Fiedler, E. Cánepa, S. Moreno, J.L. Iovanna: Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) and C/EBP β trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter. *Biochem J.* 1999; 343: 377-383

- 64)** Vasseur, S., G.V. Mallo, F. Fiedler, H. Bödeker, E. Cánepa, S. Moreno, J.L. Iovanna: Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *Eur. J. Biochem.* 1999; 259: 670-675
- 65)** Xie, M. J., Y. Motoo, S. B. Su, J.L. Iovanna, N. Sawabu: Effect of carboxamide derivative IS-741 on rat spontaneous chronic pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2002 Jan.; 47 (1): 139-147
- 66)** Zimmerman, L., B. Parr, U. Lendahl, M. Cunningham, R. McKay, J. Mann, G. Vassileva, A. McMahon: Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgen expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 1994 Jan.; 12 (1): 11-24
- 67)** Zhou, J., X. Wang, M.A. Pineyro, J.M. Egan: Glucagon-like-peptide-1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin- producing cells. *Diabetes* 1999 Dec.; 48 (12): 2358-66
- 68)** Zulewski, H., E.J. Abraham, M.J. Gerlach, P.B. Daniel, W. Moritz, B. Müller, M. Vallejo, M.K. Thomas, J.F. Habener: Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001 Mar.; 50 (3): 521-533

Danksagung

Herrn **Priv.-Doz. Dr. med. J. Seufert** danke ich besonders für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation. Mit außergewöhnlichem Engagement kümmerte er sich um die Belange seiner Doktoranden und ermöglichte mir, meine Forschungsergebnisse auf verschiedenen Kongressen mittels Poster und Vortrag zu präsentieren.

Mein Dank gilt ferner dem damaligen Leiter der Abteilung für Endokrinologie und des endokrinologischen Labors, Herrn **Prof. Dr. med. F. Jakob**. Sowohl auf Kongressen als auch während der Arbeit im Labor stand er mir stets mit freundlichem Rat zur Seite.

Als Leiter der Medizinischen Poliklinik in Würzburg hat Herr **Prof. Dr. med. K. Wilms** die Rahmenbedingungen für die Erstellung meiner Dissertation geschaffen.

Herr **Dr. rer. nat. G. Päth** war mir aufgrund seiner langjährigen Erfahrung als Biologe und Wissenschaftler bei komplexen molekularbiologischen und statistischen Fragestellungen behilflich.

Vorträge und Poster:

1. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, and F. Jakob. 1999. p8 is a novel nuclear protein associated with pancreatic beta-cell proliferation and PDX-1 promotor transactivation. *Diabetes & Metabolism*, 25 (Suppl.4) XIV (Abstr.)
2. Seufert, J., A. Knoll, **M. Gehlen**, and F. Jakob. 2000. Expansion of insulin producing cells by genetic engineering-induction of pancreatic beta-cell proliferation by a novel nuclear protein. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108:S28 (Abstr.), (Jahrestagung der DGE in München)
3. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, and F. Jakob. 2000. p8 is a novel nuclear protein associated with pancreatic beta-cell proliferation and PDX-1 promotor transactivation. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 108:S41 (Abstr.), (Jahrestagung der DGE in München)
4. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, and F. Jakob. 2000. p8 is a novel nuclear protein associated with pancreatic beta-cell proliferation. *Islet Research European Network (IREN) Workshop, "Reconstructing Endocrine Pancreas"*, Geneva, Switzerland, March 17-19, 2000 (Abstr.)
5. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, and F. Jakob. 2000. p8 is a novel nuclear protein associated with beta-cell proliferation. *Proceedings of the 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, Canada.* (Abstr.)
6. Seufert, J., A. Knoll, **M. Gehlen**, J. Roller, S. Royer, F. Jakob. 2001. Regulation of expression of the proliferation associated protein p8 in insulin producing pancreatic beta-cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109:S45 (Abstr.), (Jahrestagung der DGE in Magdeburg)
7. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, J. Roller, S. Royer, F. Jakob. 2001. Quantitative expansion of insulin producing pancreatic beta-cells by the protein p8. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109:S46 (Abstr.), (Jahrestagung der DGE in Magdeburg)
8. Seufert, J., A. Knoll, **M. Gehlen**, J. Roller, S. Royer, F. Jakob. 2001. Phenotypic and functional characterization of insulin producing pancreatic beta-cells expanded by overexpression of the novel nuclear protein p8. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109:S12 (Abstr.), (Jahrestagung der DGE in Magdeburg)
9. Seufert, J., **M. Gehlen**, A. Knoll, J. Roller, F. Jakob. 2001. Kontrollierte Expansion von Insulin produzierenden beta-Zellen. *Medizinische Klinik*, 96:198 (Abstr.), (96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Ludwig Gehlen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 18.04.75
Geburtsort: Münster
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981-1985: Mauritz Grundschule, Münster
1985-1986: Schillergymnasium, Münster
1986-1994: Gymnasium St. Xaver, Bad Driburg

Wehrdienst:

1994-1995: Sanitätssoldat, General Weber Kaserne, Höxter

Studium:

1995-1997: Humanmedizin
Universität Regensburg
September 1997: Physikum
1997- 2002: Universität Würzburg
August 1998: 1. Staatsexamen
September 2001: 2. Staatsexamen
Oktober 2002: 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

22.10.2001- 10.02.2002: Innere Medizin im Portiunkular Hospital/ Irland
(Lehrkrankenhaus der Universität Galway)
11.02.2002- 02.06.2002: Chirurgie im Ipswich Hospital/ England
(Lehrkrankenhaus der Universität Cambridge)
03.06.2002- 22.09.2002: Neurologie an der Universität Würzburg

Beruf:

Ab 15. Januar 2003: AIP-Tätigkeit im Städtischen Klinikum Osnabrück

Würzburg, den 28.06.2004