
Aus der Medizinischen Klinik II und Poliklinik der Universität Würzburg
Direktor: Herr Professor Dr.med. H.Einsele

**Transkriptionelle Regulation des Homeo-
Domänen Transkriptionsfaktors Islet/Duodenum
Homeobox-1 (IDX-1) in insulinproduzierenden
Betazellen des endokrinen Pankreas**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Andreas Peter
aus Essen
Würzburg, Februar 2005

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

Koreferent: Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Dekan: Herr Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.1.2006

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	0
1. EINLEITUNG	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Die Betazelle des endokrinen Pankreas in der Ätiologie des Diabetes mellitus.....	5
1.3. Islet /Duodenum Homeobox-1 (IDX-1).....	7
1.4. Regulation des Insulingens durch IDX-1	8
1.5. Pankreas Embryogenese.....	9
1.6. IDX-1 und Betazellneogenese	10
1.7. IDX-1 und Diabetes mellitus	11
1.8. Glukoseregulierter Metabolismus der Betazelle.....	12
1.9. Glucagon-like Peptides (GLP)	15
1.10. GLP's und IDX-1	17
1.11. Der Promotor des IDX-1 Gens.....	18
2. GRUNDLAGEN UND FRAGESTELLUNG	20
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1. Material	23
3.2. Zellkultur	25
3.3. Reportergenassays.....	28

Inhaltsverzeichnis

3.4.	Proteinkonzentrationen.....	29
3.5.	DNA und RNA Konzentrationen.....	29
3.6.	Glukose Messungen	29
3.7.	Plasmide	30
3.8.	Plasmidkarten	30
3.9.	Bakterien Transformation.....	31
3.10.	Plasmid Maxiprep	32
3.11.	Western Blot	34
3.12.	Northern RNA Blots	36
3.13.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	38
3.14.	Kernextrakt Miniprep aus Zellkulturen.....	40
3.15.	Mutational Cloning	41
3.16.	Statistische Analyse.....	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	Regulation der IDX-1 Expression durch Glukose in Betazellen des endokrinen Pankreas.....	42
4.2.	Identifizierung glukoseresponsiver DNA-Elemente im IDX-1 Promotor .	51
4.3.	Regulation des IDX-1 Promotors in Betazellen des endokrinen Pankreas durch GLP-1	58
4.4.	Autoregulation des IDX-1 Promotors in Betazellen des endokrinen Pankreas.....	60

Inhaltsverzeichnis

5.	DISKUSSION	61
5.1.	Glukose als Regulator der IDX-1 Expression.....	61
5.2.	Regulation von IDX-1 durch GLP-1	65
5.3.	Autoregulation des IDX-1 Promotors	66
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7.	LITERATURVERZEICHNIS	71
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation des Homeo-Domänen Transkriptionsfaktors Islet/Duodenum Homeobox-1 (IDX-1) in insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas untersucht.

IDX-1 ist ein mit Betazellwachstum und Neogenese assoziiertes Protein und spielt bei der Entwicklung des Diabetes mellitus eine Rolle. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der wachstumsstimulierenden Faktoren GLP-1 und Glukose auf die Expression von IDX-1 untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob IDX-1 selbst an der Regulation der eigenen Expression beteiligt ist.

In der Einleitung wird zunächst der Diabetes mellitus und der Einfluss der Regulation der Betazellmasse auf die Entstehung der Erkrankung erläutert.

Danach wird die Bedeutung des Transkriptionsfaktors IDX-1 für Betazellfunktion, Embryogenese und Pathogenese des Diabetes mellitus beschrieben.

Anschließend werden die wachstumsstimulierenden Faktoren GLP-1 und Glukose charakterisiert, sowie Vorarbeiten im Zusammenhang mit IDX-1 besprochen. Schließlich wird der IDX-1 Promotor beschrieben, an dem die Experimente durchgeführt wurden.

1.1. Diabetes mellitus

Bei der Erkrankung Diabetes mellitus ist der Körper nicht in der Lage den Blutzuckerspiegel in einem physiologischen Bereich zu regulieren. Es liegt ein gestörtes Verhältnis von glukoseabhängiger Insulinsekretion der insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas und Insulinwirkung in den Zielgeweben des Organismus vor. Die heutige Klassifikation des Diabetes mellitus richtet sich nach den Vorschlägen einer Expertenkommission unter Leitung der *American Diabetes Association* (ADA), die 1997 in Boston vorgestellt wurde. Diese versucht die Erkrankung nach ätiologischen Gesichtspunkten in einen Typ-1 und einen Typ-2 zu klassifizieren. Frühere deskriptive Bezeichnungen wie IDDM (*Insulin Dependent Diabetes mellitus*) und

NIDDM (*Non Insulin Dependent Diabetes mellitus*) werden nicht mehr verwendet. Daneben unterscheidet man andere, spezifische Typen. Zu diesen zählen die früher als MODY (*Maturity Onset Diabetes mellitus of the Young*) bezeichneten genetischen Defekte der Betazellfunktion (1-3).

1.1.1. Typ-1 Diabetes mellitus

Beim Typ-1 Diabetes handelt es sich um eine Erkrankung, die mit einer Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas einhergeht. Durch Verlust der Betazellen entsteht ein absoluter Insulinmangel. Die selektive Betazellzerstörung kann sowohl autoimmun bedingt, als auch idiopathisch sein. Die Ursache für die T-zellvermittelte autoimmune Zerstörung der Betazellen ist nicht bekannt. Es besteht eine sehr geringe familiäre Belastung; exogene Faktoren wie Infektionen scheinen Auslöser der immunpathologischen Reaktion zu sein. Die Inzidenz der Typ-1 Erkrankung ist stabil. Der durch Verlust der Betazellen entstehende absolute Insulinmangel wird heute durch Injektion von Insulin substituiert (2).

1.1.2. Typ-2 Diabetes mellitus

Der Typ-2 Diabetes, an dem etwa 95% der Diabetiker in Deutschland leiden, kann vielfältige Ursachen haben. In den meisten Fällen liegt eine periphere Insulinresistenz, gekoppelt mit einer Betazellfunktion vor. Die defekten Betazellen sind nicht in der Lage den gestiegenen Bedarf an Insulin zu decken (3,4). Besonders zu Beginn der Erkrankung liegt bei den meisten Patienten eine Hyperinsulinämie und nur ein relativer Insulinmangel vor. Durch anhaltende Hyperglykämien, die für Betazellen toxisch sind, kommt es durch den Verlust von Betazellen zum sekundären Versagen der Insulinproduktion und zur Insulinpflichtigkeit (5-7).

Nachdem lange Zeit die periphere Insulinresistenz als alleinige Ursache der Erkrankung angesehen wurde, hat man erkannt, dass auch die genetische Disposition der Betazellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt. Mangelnde Anpassungsfähigkeit an einen veränderten Insulinbedarf scheint häufig die Ursache der Krankheit zu sein (3,4,8).

Die Krankheit zeigt einen polygenen Erbgang mit hoher familiärer Prädisposition. Bei eineiigen Zwillingen sind zu über 60% beide Geschwister betroffen (3). Für die Manifestation des Diabetes mellitus Typ-2 ist die Adipositas von entscheidender Bedeutung. In westlichen Gesellschaften mit hochkalorischer, fettreicher Kost und Überernährung steigt die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ-2 stark an. In Deutschland hat sich die Zahl der Diabetiker seit 1950 fast verzehnfacht (11-14). Etwa 80% der Patienten sind übergewichtig. Durch Gewichtsreduktion und körperliches Training kann bei Risikopersonen das Auftreten der Krankheit verhindert werden (12,13). Diabetes mellitus wird als Teil des metabolischen Syndroms, mit Übergewicht, arterieller Hypertonie, Fettstoffwechselstörung und Hyperurikämie gesehen (14-16). Therapeutisch versucht man, neben Maßnahmen zur Gewichtsreduktion, die vorhandenen Betazellen pharmakologisch zu verstärkter Insulinsekretion zu stimulieren und die periphere Insulinresistenz zu verringern.

1.1.3. Andere spezifische Typen

Man unterscheidet eine wachsende Reihe spezifischer Diabetes mellitus Typen. Zu diesen zählen auch die früher als MODY (*Maturity Onset Diabetes mellitus of the Young*) bekannten genetischen Defekte der Betazellfunktion. Beim MODY liegen Genmutationen in Betazellspezifischen Genen vor, die monogen in der Lage sind einen nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus hervorzurufen. Dieser tritt meist im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt auf und wird charakteristischerweise autosomal dominant vererbt.

Etwa 5% der Patienten mit einem nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus weisen einen Defekt in einem MODY-Gen auf.

Bisher sind 5 MODY-Gene identifiziert worden:

- HNF-4-alpha, Chromosom 20
- Glucokinase , Chromosom 7
- HNF-1-alpha , Chromosom 12
- IPF-1, Chromosom 13 (siehe Kapitel 1.7)
- mitochondriale DNA

1.1.4. Komplikationen

Diabetes mellitus ist zwar heute keine akut lebensbedrohliche Erkrankung mehr, dennoch bleiben bisherige Therapiemethoden unbefriedigend. Die Patienten können weitgehend symptomfrei gehalten und eine Unter- oder Überzuckerung vermieden werden, eine Einstellung auf physiologische Blutzuckerspiegel ist jedoch kaum möglich. Auch Versuche, die natürliche Insulinsekretion durch intensivierete Insulintherapie nachzuahmen, können den Blutzuckerspiegel nur schwer adäquat einstellen. Zudem ist diese Methode mit viel Aufwand verbunden und nur für gut geschulte Patienten zugänglich. Diabetes mellitus verursacht erhebliche Spät komplikationen, wie Erblindung, Niereninsuffizienz, koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, cerebrovaskuläre Erkrankungen und Polyneuropathien. In den USA sind zwei Drittel aller nicht traumatisch bedingten Amputationen Folge eines Diabetes mellitus. Diabetes mellitus ist die häufigste Ursache für eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz und Erblindung im Erwachsenenalter. Über die Hälfte aller männlichen Diabetiker über 50 Jahren leidet an Impotenz. In den USA verursachen Diabetiker etwa viermal höhere Kosten im Gesundheitswesen als der Bevölkerungsdurchschnitt (17).

1.1.5. Neue Therapieansätze

Neuere Therapieansätze zielen darauf ab, dem Diabetiker eine ausreichende Menge an Betazellen zur Verfügung zu stellen, um eine physiologische, glukoseabhängige Insulinsekretion zu gewährleisten. Nur so können eine optimale Blutzuckerregulation erreicht und Spätschäden vermieden werden. Versuche, Typ-1 Diabetiker durch Transplantation von Betazellen zu behandeln, zeigten erste viel versprechende Erfolge (18). Die dazu notwendige Menge an Inselzellen ist jedoch zu groß, als dass dieses Verfahren einer großen Patientengruppe zur Verfügung gestellt werden könnte. Vielmehr stehen heute Mechanismen der Regulation von Proliferation und Neuentstehung von Betazellen in vivo im Mittelpunkt des Interesses. Ziel ist es, diese Prozesse genauer zu verstehen, um sie manipulieren zu können. Die Erhöhung der Betazellmasse in vivo kann dem Typ-2 Diabetiker helfen. Herstellung und

Expansion von Betazellen in Kultur kann eine Quelle für Zellen zur Transplantation von Typ-1 Diabetikern darstellen.

1.2. Die Betazelle des endokrinen Pankreas in der Ätiologie des Diabetes mellitus

Bis vor wenigen Jahren bestand die Vorstellung, der Mensch werde mit einer Population an nicht vermehrungsfähigen Betazellen geboren, mit der er sein Leben lang auskommen müsse. Durch periphere Insulinresistenz kommt es, so dachte man, ohne Veränderung an der Betazelle, zum relativen Insulinmangel und zum Diabetes mellitus Typ-2 (19). Das heutige Konzept der Krankheit stellt die Betazelle in den Mittelpunkt des Interesses. Man hat gelernt, dass Betazellen teilungsfähig sind, und die Gesamtmasse durch Proliferation, Hypertrophie, Neogenese, aber auch Apoptose genau an die Bedürfnisse des Organismus angepasst werden kann. Ein erhöhter Insulinbedarf, wie er zum Beispiel in der Schwangerschaft, bei peripherer Insulinresistenz oder beim adipösen Patienten vorkommt, kann so durch Zunahme der Betazellmasse ausgeglichen und ein normoglykämischer Zustand aufrechterhalten werden. Eine mangelnde Anpassungsfähigkeit führt dabei bei einigen Patienten zum Insulinmangel und Hyperglykämie. Dies erklärt die Beobachtung, dass lediglich 15-20 % der adipösen Patienten einen Diabetes mellitus entwickeln (19).

1.2.1. Physiologische Adaptation der Betazellmasse

Während der Schwangerschaft, in der durch antagonistisch wirkende Hormone ein erhöhter Insulinbedarf vorliegt, findet man in Ratten eine Zunahme der Betazellmasse im endokrinen Pankreas um ca. 50%. *Post partum* normalisiert sich diese innerhalb von zehn Tagen durch gesteigerte Apoptose und verminderte Proliferation wieder (22,23). Die Anpassung des endokrinen Pankreas an periphere Insulinresistenz bekannter Ursache konnte im Tiermodell eindrucksvoll demonstriert werden. In Mäusen mit heterozygoter Ausschaltung (*Knockout*) der Gene für den Insulinrezeptor (IR-ko) und des Insulinrezeptorsubstrats-1 (IRS1-ko), die mit 26-fach erhöhten Plasmainsulinspiegeln eine starke Insulinresistenz zeigten und im Alter von

sechs Monaten diabetisch wurden, fand man eine zehnfach erhöhte Betazellmasse (21).

1.2.2. Modelle für Neogenese und Zellproliferation

Erhöht man in Ratten den Blutglukosespiegel durch eine 48-stündige Glukoseinfusion, kann man eine starke kompensatorische Zunahme der Betazellmasse beobachten. Selbst nach 90%iger Pankreatektomie zeigt das endokrine Pankreas eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit. Behandlung der Tiere mit dem enteroendokrinen Hormon Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) verstärkt diese Regeneration. Auch in nicht operierten Tieren ist GLP-1 in der Lage eine deutliche Zunahme der Betazellmasse zu bewirken (25-28).

1.2.3. Verlust von Betazellmasse

Auch ein Verlust von Betazellen kann als Anpassung an veränderte Umstände mit erniedrigtem Insulinbedarf beobachtet werden. Bei Ratten findet man nach Absetzen einer Glukoseinfusion, oder post partum gesteigerte Apoptose und verminderte Proliferation, die zur Normalisierung der Betazellmasse innerhalb von zehn Tagen führen (22,25). Nach Transplantation von Insulinomen in Ratten findet man reaktiv apoptotische Beta- Zellen. Diese experimentellen Ergebnisse werden durch die Beobachtung von Inselzellatrophie bei Insulinompatienten gestützt (23). Das endokrine Pankreas ist in erstaunlichem Maße in der Lage sich an einen vermehrten oder verringerten Insulinbedarf anzupassen. Die Betazellmasse wird genau reguliert. Auch wenn Faktoren wie GLP-1 oder Insulin Einfluss auf die Betazellmasse haben, so scheint Glukose der entscheidende Regulator der Betazellmasse zu sein. Signalisiert doch mäßige Hyperglykämie in vivo nichts anderes als einen Bedarf an insulinproduzierenden Betazellen, um die periphere Glukoseaufnahme zu steigern und Normoglykämie zu erreichen. In vitro ist lange bekannt, dass die Wachstumsrate von Insulinomzellen in der Zellkultur maßgeblich von der Glukosekonzentration im Nährmedium abhängt.

Die Replikation von Betazellen in vivo wurde durch Mitosefiguren in insulinhaltigen Zellen eindeutig belegt. Allerdings macht sie neben der Neogenese aus Vorläuferzellen nur einen Teil der Betazellregeneration aus.

Aus den Pankreasgängen aussprossende Inseln während der Regeneration und schnell proliferierende Zellen im Gangepithel, die IDX-1 exprimieren, lassen auf die Pankreasgänge als Sitz der Vorläuferzellen schließen (30-32).

1.2.4. Stammzellen

In Kultur gelang es, solche Vorläuferzellen aus Pankreasgängen zu vermehren und zu hormonproduzierenden Zellen zu differenzieren (25). Andere Gruppen isolierten direkt aus Langerhans'schen Inseln bis dahin unbekannte Zellen, die den neuronalen Stammzellmarker Nestin exprimieren. Diese Zellen konnten in vitro zur Formation von inselartigen Strukturen und zur Produktion von Insulin und Glucagon stimuliert werden (34,35). Die Suche nach der einen Stammzelle ist also noch nicht abgeschlossen. Es ist jedoch von entscheidender Bedeutung herauszufinden, wodurch die Differenzierung von Stammzellen im Erwachsenen gesteuert und die Betazellmasse reguliert wird. Eine wichtige Rolle spielt hierbei der Transkriptionsfaktor IDX-1.

1.3. Islet /Duodenum Homeobox-1 (IDX-1)

Das Homeo-Domänen-Protein Islet /Duodenum Homeobox-1 (IDX-1) ist ein zentraler Regulator der Pankreasentwicklung und der Insulingenexpression. Ursprünglich wurde es in verschiedenen Laboratorien gleichzeitig kloniert und ist daher heute unter verschiedenen Namen bekannt:

STF-1 (*Somatostatin Transcription Factor 1*) (27); IPF-1 (*Homo sapiens Insulin Promoter Factor 1*) (28); IUF-1 (*Insulin Promoter Upstream Factor-1*) (29); PDX-1 (*Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene-1*) (30); GSF (*Glucose Sensitive Factor*) (31); IDX-1 (Islet /Duodenum Homeobox-1) (32).

Zur Bezeichnung des Gens beim Menschen hat man sich auf den Namen IPF-1 geeinigt (*The Human Genome Database Nomenclature Committee*).

So genannte Homeo-Boxen sind stets wiederkehrende Motive in Genen, welche die Entwicklung von Insekten und Wirbeltieren steuern. Homeo-Boxen verschiedener Spezies weisen starke Homologien auf. Sie bestimmen die Identität ganzer Körpersegmente. Mutationen in diesen Genen können zur

Veränderung ganzer Gliedmaßen führen. Ein Beispiel hierfür ist die Umwandlung der Antenne in ein Bein bei Insekten (33).

Die Homeo-Box kodiert eine Protein-Homeo-Domäne, welche die DNA-Bindung dieser Transkriptionsfaktoren vermittelt (34). IDX-1 ist ein Homeo-Domänen-Protein mit 283 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 30.9 KD.

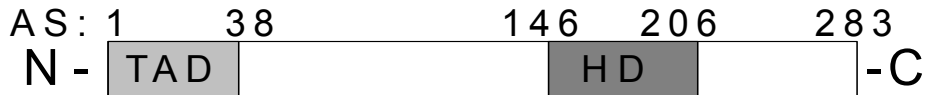


Abbildung 1: Lineares Schema des IDX-1 Proteins. TAD Transaktivierungsdomäne, HD Homeo-Domäne.

Die Homeo-Domäne von IDX-1 (AS 146-206) ist vom Typ der so genannten Antennapedia Gene bei *Drosophila melanogaster* und besitzt starke Homologien zu pankreatischen Proteinen von *Xenopus laevis* und dem Zebrafisch (35-36). Die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von IDX-1 wurde im N-terminalen Bereich von AS 1-38 lokalisiert (34,37-39). Die nukleäre Translokation des Proteins wird durch Sequenzen innerhalb der Homeo-Domäne gesteuert (34,36,40-41).

1.4. Regulation des Insulingens durch IDX-1

IDX-1 wurde als Regulator des Insulin- und Somatostatingens identifiziert. Das Protein reguliert jedoch auch andere pankreasinselspezifische Gene, wie Glut-2 (42), *Islet Amyloid Peptid* (43) und Glukokinase (44). In Betazellen bindet IDX-1 im Ratten Insulin Promotor I (RIP I) an zwei so genannte A-Boxen und bildet mit den Transkriptionsfaktoren E 12/47, Beta 2 und p300 einen transkriptionellen Komplex (**Abbildung 2**), der für die Insulingenexpression von zentraler Bedeutung ist (45,46). IDX-1 vermittelt die Anpassung der Insulingenexpression an extrazelluläre Glukosekonzentrationen. Dies geschieht durch glukoseabhängige Translokation in den Zellkern, Phosphorylierung und Erhöhung der DNA Bindungsaffinität, sowie des Transaktivierungspotentials (48,55-57).

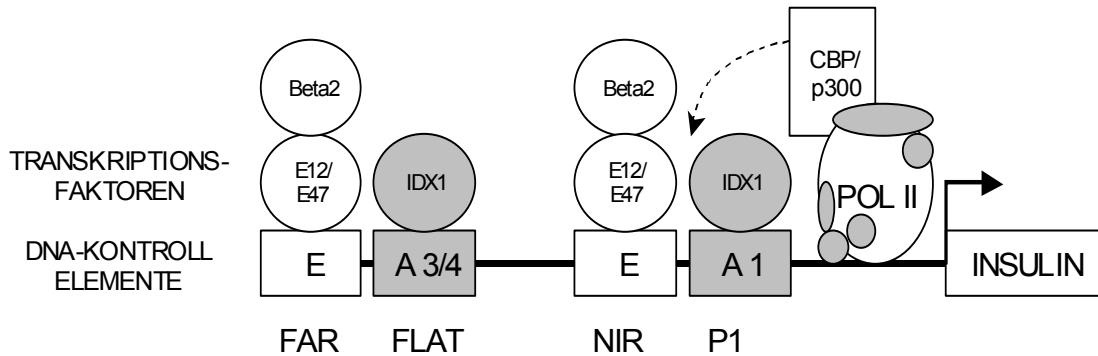


Abbildung 2: Glukoseresponsive Elemente und DNA-Bindungsstellen für IDX-1 im Ratten Insulin Promotor I

1.5. Pankreas Embryogenese

Das Expressionsmuster von IDX-1 im Vorderdarm fällt zeitlich und örtlich mit der sich entwickelnden Pankreasanlage zusammen und spiegelt damit die Differenzierung von Entoderm zu einem pankreatischen Phänotyp wieder (47). In der Maus ist IDX-1 Expression zuerst am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung (e8.5) in einem schmalen Band Vorderdarm-entoderm nachweisbar (48). Während der weiteren Pankreasentwicklung wird IDX-1 entlang der sich entwickelnden Pankreasgänge exprimiert. Nachdem sich Pankreasinseln gebildet haben, wird IDX-1 in hormonproduzierenden Zellen exprimiert (48,49). Eine Kolokalisation mit exokrinen Enzymen kann anfangs noch beobachtet werden (e13.5), nimmt jedoch im Verlauf deutlich ab (e16.5) und ist im erwachsenen Organ so gut wie nicht mehr nachzuweisen. Bei Erwachsenen beschränkt sich die Expression von IDX-1, mit Ausnahme einiger somatostatinproduzierender δ -Zellen und weniger PP-produzierender Zellen, auf die insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas. Ein Reportergen, das von den 4.6 Kilobasen upstream des Maus-IDX-1-Gens getrieben wird, bildet die Expression des Homeo-Domänen-Proteins während

der Embryo- und Organogenese in transgenen Mäusen zuverlässig ab (50). Dieser DNA-Bereich enthält somit alle für die entwicklungs- und zellspezifische Expression des IDX-1 Gens wichtigen DNA-Regulationselemente (27-28,32,47,50). Durch gezielte Mutation von IDX-1 im Mausmodell bleibt die Entwicklung des Pankreas aus (Pankreasagenesie) (30,51). Die homozygoten Knockout-Tiere werden lebend geboren, sterben jedoch wenige Tage nach der Geburt (51). Diese Tiere entwickeln rudimentäre Pankreasknospen mit einem gering entwickelten Pankreasganggeflecht in der dorsalen Knospe, bevor es zum Stillstand der Pankreasentwicklung kommt. Auch im rostralen Duodenumepithel und in den enteroendokrinen Zellen kommt es zu Entwicklungsdefekten (30). Das Pankreasmesenchym in IDX-1 mutierten Mäusen entwickelt sich normal, während das Pankreasepithel nicht in der Lage ist auf mesenchymale Signale zu reagieren und sich vollständig zu differenzieren (52). Im Menschen wurde ein Fall von Pankreasagenesie auf eine homozygote Punktmutation im IDX-1 Gen mit Funktionsverlust zurückgeführt (53). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung des Transkriptionsfaktors IDX-1 für die Pankreasentwicklung sowohl in der Maus, als auch beim Menschen.

1.6. IDX-1 und Betazellneogenese

Im adulten Pankreas wird die Betazellmasse durch Apoptose, Proliferation, und Neogenese aus Vorläuferzellen determiniert. Im Computermodell wurde die Halblebenszeit für Betazellen in Nagetieren auf ungefähr 30-60 Tage berechnet (54). Die Herkunft sich neu entwickelnder Inseln ist noch unklar. Es wurden mehrere Arten von Vorläuferzellen innerhalb der Pankreasgänge, aber auch in den Inseln selbst identifiziert. Die Regeneration des Pankreas wurde in Modellen mit teilweiser Pankreatektomie und Behandlung mit dem Betazelltoxin Streptozotocin studiert. Nach Pankreatektomie kommt es zu einer vermehrten Entwicklung von neuen Pankreasinseln, welche hauptsächlich von den Pankreasgängen aussprossen. Das Pankreas weist während Phasen der Regeneration eine erhöhte Expression von IDX-1 auf (55).

Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Modellen des verstärkten Inselwachstums, bei jungen Tieren und unter GLP-1 Infusion gemacht. Sie deutet auf einen Zusammenhang zwischen IDX-1 und Betazellneogenese hin. Auf der anderen Seite führten Faktoren, welche den IDX-1 Spiegel senken, zur Beeinträchtigung der Betazellneogenese und zu einer verminderten Betazellmasse (56). Unter Behandlung mit GLP-1 differenzierte sich die duktale Zelllinie AR42J in einen Insulin und Glucagon produzierenden Phänotyp. Währenddessen nahm die IDX-1 Expression zu (57). Transiente Transfektion von IDX-1 allein genügte, um die duktale Zelllinie Capan-1 zur Insulinproduktion anzuregen (58). Eindrucksvoll ist die Verbesserung von Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie in Mäusen durch Expression von IDX-1 in der Leber. Adenovirusvermittelte Expression von IDX-1 in der Leber differenziert einen Teil der Leberzellen, offenbar die Leberstammzellen, in einen Betazellphänotyp. Diese Zellen sind nicht nur in der Lage biologisch aktives Insulin zu produzieren, sondern können dieses auch glukoseabhängig freisetzen. Die Streptozotocin-induzierte Hyperglykämie kann so behoben und ein physiologischer Blutglukosespiegel erreicht werden (59). Neben der Bedeutung von IDX-1 für die Betazellneogenese zeigt dieser Versuch die enge Verwandtschaft von Leber und Pankreasstammzellen.

1.7. IDX-1 und Diabetes mellitus

Diabetes mellitus Typ-2 kommt durch Insulinresistenz und einer Betazell dysfunktion zustande. Es wurden Genmutationen in Betazellspezifischen Genen identifiziert, die monogen in der Lage sind einen nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus hervorzurufen, den so genannten MODY (*Maturity Onset Diabetes mellitus of the Young*). Dieser tritt im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt auf und wird charakteristischerweise autosomal dominant vererbt. Eine inaktivierende IDX-1 Genmutation im Chromosom 13q12.1 wurde als Ursache für MODY-4 identifiziert (60). Auch bei Typ-2 Diabetikern konnten multiple Mutationen im IDX-1-Gen gefunden werden (61-62). Als Pathogenitätsmechanismen werden eine Fehlregulation der Betazellmasse und Funktion sowie der Insulingenexpression diskutiert. In

Tiermodellen versuchte man, die Funktion von IDX-1 genauer zu studieren. Heterozygote *knockout* Mäuse IDX-1(+/-) zeigten neben einer eingeschränkten Glukosetoleranz auch Veränderungen in der Inselmorphologie (52, 63-64). Einer verringerten Betazellmasse steht eine Vermehrung von nicht Betazellen, besonders glucagonpositiven α -Zellen gegenüber. Beim homozygoten, betazellspezifischen *Cre-lox-knockout* von IDX-1, bei dem das Gen erst nach Abschluss der Pankreasentwicklung durch die induzierbare *Cre-Recombinase* entfernt wird, entwickeln die Tiere im Alter von 17-19 Wochen Diabetes mellitus (63). Es kann jedoch auch ohne Mutationen oder *knockouts* durch Downregulation der IDX-1 Expression zur Betazell dysfunction kommen. Senkt man im Tiermodell induzierbar die IDX-1 Expression, kommt es zunächst zu eingeschränkter Glukosetoleranz und in Verbindung mit Alter und Geschlecht zur Entwicklung von Diabetes mellitus (65-66). In vitro konnten Faktoren identifiziert werden, die eine IDX-1 Downregulation bewirken. So führt lang anhaltende Hyperglykämie in Betazellen zur IDX-1 Downregulation und gestörter Proinsulingenexpression (7, 67-68). Dieser Verlust an IDX-1 geht mit der Induktion von C/EBP β einher. C/EBP β verhindert durch Interaktion mit E47, einem Aktivator des Insulingens, dessen DNA Bindung und vermittelt so den inhibitorischen Effekt auf die Insulingenexpression (7, 70). Dieser als Glukotoxizität bekannte Funktionsverlust ist durch Transfektion mit exogenem IDX-1 teilweise reversibel (71). Auch für freie Fettsäuren (72) und Glukokortikoide konnte in vitro ein ähnlicher Effekt gezeigt werden (73-74). Normoglykämische Einstellung von beginnendem Diabetes mellitus kann den glukotoxischen Verlust von IDX-1 verhindern, Betazellmasse und endogene Insulinproduktion stabilisieren und die Krankheitsprogredienz bremsen (75-77). IDX-1 spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Typ-2 Diabetes. Ein besseres Verständnis seiner Regulation kann therapeutische Ansatzpunkte aufzeigen.

1.8. Glukoseregulierter Metabolismus der Betazelle

Die wahrscheinlich charakteristischste Eigenschaft der Betazelle ist ihre Brennstoffsensitivität. Die Betazelle nimmt in sehr fein gesteuerter Weise das

Nahrungs-, insbesondere das Glukoseangebot des Körpers wahr, und stellt durch angepasste Insulinsekretion die Energieversorgung der Körperzellen mit Glukose sicher. Damit ist die Betazelle an der Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Blutglukosespiegels maßgeblich beteiligt. Metabolismus und Genexpression der Betazelle sind weitgehend auf diese Funktionen ausgerichtet. **Abbildung 3** zeigt vereinfacht beteiligte Signalwege (56).

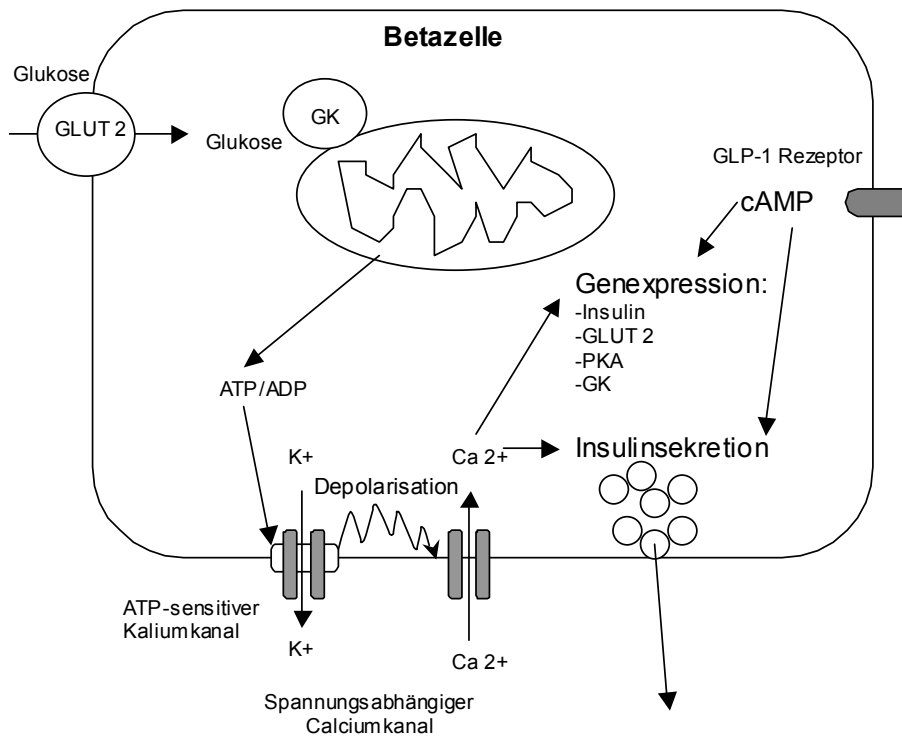


Abbildung 3: Schema der glukoseabhängigen Insulinsekretion und Genexpression in Betazellen

Insulinsekretion ist an den intrazellulären Glukosespiegel der Betazelle gekoppelt, der dem Plasmaglukosespiegel entspricht. Glukose gelangt über den low-affinity Glukosetransporter GLUT-2 in die Betazelle. Im physiologischen Bereich verhält sich dessen Förderung proportional zur extrazellulären Glukosekonzentration und bewirkt so eine Projektion des Plasmaglukosespiegels in die Betazelle. Die Glukoseaufnahme in Körperzellen dagegen ist insulinabhängig und weicht von der in Betazellen ab.

Intrazellulär wird durch den Stoffwechsel von Glukose in Zitronensäurezyklus und Atmungskette ATP aus ADP gewonnen. ATP ist der wichtigste

Energieträger der Zelle und das Verhältnis ATP/ADP zeigt den Energiegehalt der Zelle an. Betazellen besitzen einen ATP-sensitiven Kaliumkanal (*inward rectifying potassium channel*), der aus dem Kanal Kir 6.2 und der regulatorischen Einheit SUR 1 (Sulfonylharnstoff Rezeptor 1) besteht. Hohe ATP/ADP Verhältnisse öffnen den Kanal und führen so zur Depolarisation der Zelle. Der Energiegehalt der Betazelle ist der Signalgeber für die Insulinsekretion. Durch die geringe Glukoseaffinität des GLUT-2 Transportes steht der Betazelle nur wenig Glukose zur Verfügung und sie lebt normalerweise im Hungerzustand. Signalgebende ATP/ADP-Spiegel werden daher nur bei Hyperglykämie erreicht. Bei Depolarisation der Betazelle öffnet sich ein spannungsabhängiger Kalziumkanal und führt zum Einstrom von Kalziumionen. Ca_2^+ ist ein intrazellulärer Signalstoff, der in Betazellen die Freisetzung von Insulinvesikeln bewirkt. Neben der Insulinsekretion wird auch die Genexpression glykolytischer Enzyme und des Proinsulingens erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Expression der Gene für PFK-1, GADPH, L-PK sowie GLUT-2, Gukokinase und PI3K durch Glukosestimulation gesteigert wird (78). Expression Profiling in klonalen INS-1 Betazellen zeigte starke Regulation (>2.2-fach) der Expression von 78 Genen, darunter viele Sekretions- und Metabolismusgene (79). Zudem ist Glukose ein starker Wachstumsstimulus für Betazellen. IDX-1 reguliert als zentraler Regulator der Betazelle die Expression einiger dieser glukoseabhängigen Gene. Bei der Expression des Proinsulingens ist IDX-1 unter anderen für die Vermittlung der Glukoseresponsivität verantwortlich. Die Betazelllinie NES2Y, die kein IDX-1 exprimiert, zeigt keine glukoseabhängige Insulingenexpression. Diese kann durch Transfektion von IDX-1 wiederhergestellt werden (80). IDX-1 selbst wird durch Glukosestimulation über einen PI3K abhängigen Signalweg phosphoryliert und in den Kern transloziert (81). Dabei erhöht sich sowohl die DNA Bindungsaktivität, als auch das Transaktivierungspotential der N-terminalen Domäne (39,82).

1.9. Glucagon-like Peptides (GLP)

Glucagon-like Peptides sind potente bioaktive Peptide. Sie entstehen durch gewebsspezifisches, alternatives Splicing aus dem Präproglucagonen in enteroendokrinen L-Zellen, den α -Zellen des endokrinen Pankreas und Neuronen im ZNS (83-84). GLP-1, das postprandial aus L-Zellen des Darmepithels freigesetzt wird, ist ein potenter Stimulus für die Insulinsekretion. Neben der insulinotropen Wirkung sind Verringerung der Magenmotilität, Senkung des Plasmaglucagonspiegels, Sättigungsgefühl und insulinunabhängige periphere Glukoseaufnahme ins Gewebe die Hauptwirkungen. Diese physiologischen Effekte machen GLP-1 für die Therapie des Diabetes mellitus interessant. GLP-1 stimuliert rezeptorvermittelt die Insulinsekretion und Proinsulingenexpression. Da für die Steigerung der Insulinsekretion durch GLP-1 Glukose erforderlich ist, kann es keine Hypoglykämien hervorrufen (85). Die Sekretion von GLP-1 aus L-Zellen erfolgt nach oraler Nahrungsaufnahme oder intrajejunaler Glukoseinfusion (Inkretin-Konzept). Parenterale Glukosezufuhr hat keinen Einfluss auf die GLP-1 Ausschüttung (83).

Möglicherweise wird die Sekretion von GLP-1 durch GIP (Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide) vermittelt. Somatostatin hemmt die GLP-1 Sekretion. Postprandiale GLP-1 Freisetzung verhilft Betazellen zu einer rascheren und effizienteren Anpassung der Insulinsekretion an einen Glukosestimulus und damit zu einer besseren Regulation des Blutzuckerspiegels. Dies wird bei einem Vergleich der Blutzucker und Insulinkonzentrationsverläufe nach intravenöser (keine GLP-1 Freisetzung) und intrajejunaler (GLP-1-Freisetzung) Glukoseinfusion deutlich. Bei intrajejunaler Glukoseinfusion kommt es zu einer rascheren Blutzuckernormalisierung; Spitzen werden abgeflacht (86).

Neben diesen kurzfristigen Effekten werden auch Langzeiteffekte auf Betazellen beobachtet. Glukoseintoleranz, die charakteristischerweise bei 18-20 Monate alten Ratten auftritt, ist durch GLP-1 reversibel. In diabetischen Ratten führt das GLP-1-Analogon Exendin-4 durch gesteigerte Betazellreplikation und Neogenese zu erhöhter Betazellmasse und Glukosetoleranz. Als Beleg für die Eigenschaft als Differenzierungsfaktor

bewirkt GLP-1 in Kultur eine Differenzierung von Pankreasgangzellen (ARIP) in insulinproduzierenden Zellen (57, 87).

Zirkulierendes GLP-1 (7-36amid) wird in vivo sehr schnell durch N-terminale enzymatische Spaltung durch das Enzym DPP-IV zu GLP-1 (9-36amid) abgebaut (88-91). Die HWZ im Plasma beträgt weniger als 2 Minuten.

GLP-1 (9-36amid) bindet mit geringer Affinität an den GLP-1 Rezeptor und wirkt als schwacher kompetitiver Antagonist. In vitro lässt sich die Stabilität des Peptidhormons durch Proteaseinhibitoren wie Aprotinin erhöhen. Die geringe HWZ in vivo schränkt die pharmakologischen Einsatzmöglichkeiten erheblich ein. Die Entdeckung neuer stabilerer GLP-1 Agonisten gab die Möglichkeit zu vereinfachten Studien im Tiermodell.



Abbildung 4: *Heloderma horridum*: Aus dem Gift des Gilamonsters *Heloderma horridum* wurde Exendin-4 isoliert. Es ist ein potenter Agonist von GLP-1 und gegen enzymatische Spaltung resistent. (Mit freundlicher Genehmigung der Zoological Society of San Diego, CA, USA)

Die Peptide Exendin-3 und Exendin-4 wurden ursprünglich aus dem Gift des Gilamonster Lizard *Heloderma suspectum* und *Heloderma horridum* (**Abbildung 4**) isoliert. Beide haben eine ca. 50%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz mit Säugetier-GLP-1. Exendin-4 ist ein starker GLP-1-

Agonist und zeichnet sich durch eine erhöhte Resistenz gegen DPP-IV aus. Daher besitzt es in vivo eine längere HWZ und ist weit potenter als GLP-1. Allerdings können beide Peptidhormone nur parenteral verabreicht werden, da sie bei oraler Aufnahme verdaut werden. In Versuchen genügte GLP-1 allein, kontinuierlich parenteral über einen Perfusor verabreicht, um Typ-2 Diabetiker normoglykämisch zu halten (92). Derzeit gehen die Bemühungen, GLP-1 als Behandlung des Diabetes mellitus Typ-2 einzusetzen, in zwei Richtungen: Einerseits wird versucht stabilere GLP-1 Analoga zu entwickeln, die gegen DPP-IV Spaltung resistent sind und daher eine längere Halbwertszeit haben. Außerdem wird versucht oral verabreichbare GLP-1 Analoga herzustellen. Andererseits werden hoch spezifische DPP-IV Inhibitoren entwickelt, die auch im Menschen eingesetzt werden können. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Spaltung des Peptidhormons GLP-1 durch DPP-IV eine physiologische Bedeutung hat. GLP-1, nicht aber Exendin-4, hat in vivo einen peripher insulinsensitivierenden Effekt. Da die Wirkung der beiden Peptide am Pankreas identisch ist, wird vermutet, dass der peripher insulinsensitivierende Effekt durch das Spaltprodukt GLP-1(9-36amid) bewirkt wird. Durch eine Verabreichung von Proteaseinhibitoren oder Exendin-4 würde man diesen beim Diabetiker erwünschten Effekt verlieren (93-95).

1.10. GLP's und IDX-1

Die glukoseabhängige Regulation des Ratten Insulin Promotors 1 durch GLP-1 erfolgt unter anderem durch den Transkriptionsfaktors IDX-1.

IDX-1 bindet an den Insulinpromotor und aktiviert die Transkription im Zusammenspiel mit E47/E12, Beta 2 und p300 (**Abbildung 2**).

Ein Verlust an IDX-1 führt daher zu verminderter Promotoraktivierung und Insulingenexpression. In vitro konnte gezeigt werden, dass Inkubation von klonalen Betazellen in 10 nM GLP-1, ähnlich wie Glukose, IDX-1 in den Nukleus transloziert und DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität am A1 Element des Ratten Insulin Promotors steigert. Die durch GLP-1 gesteigerte Insulingenexpression wird so über IDX-1 vermittelt. Effekte als Wachstums- und Differenzierungsfaktor erfordern die Expression von IDX-1 und zeigen auch hier

das enge Zusammenspiel von GLP-1 und IDX-1. In vitro Daten legen nahe, dass GLP-1 auch direkt IDX-1 mRNA Expression in INS-1 Zellen stimuliert (96-97). In Kultur bewirkt GLP-1 eine Differenzierung von Pankreasgangzellen (ARIP) zu insulinproduzierenden Zellen. Für diese Eigenschaft als Differenzierungsfaktor ist die Expression von IDX-1 erforderlich (87).

1.11. Der Promotor des IDX-1 Gens

Der Promotor eines Gens enthält Regulationselemente, Enhancer und Silencer, welche die Expression eines Gens gewebsspezifisch steuern. Um sicherzugehen, dass eine Region, die man für den Promotor eines Gens hält, alle wichtigen Regulationselemente enthält, exprimiert man in transgenen Mäusen ein Reporter-gen unter Kontrolle dieser Region. Die Expression des Reporter-gens wird dann mit der des Proteins verglichen. Ein von 4.6 KB 5'-des Maus-IDX-1-Gens getriebener Reporter bildet die entwicklungsgeschichtliche Expression des Homeo-Domänen-Proteins zuverlässig ab. Dieser Bereich enthält somit alle für die entwicklungs- und zellspezifische Expression des IDX-1 Gens wichtigen Regulationselemente (27-28,32,47,50).

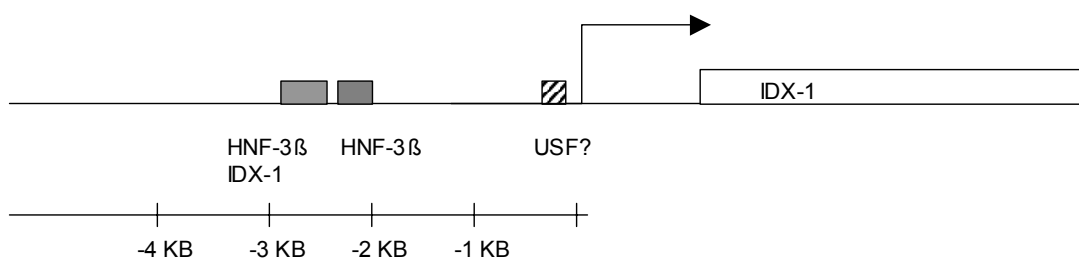


Abbildung 5: Schema des Maus IDX-1 Promotors mit Lokalisation der bisher identifizierten Regulationselemente.

Obwohl die Funktions- und Expressionsmuster von IDX-1 in vielen Spezies (Maus, Ratte, Huhn, Mensch) sehr ähnlich sind zeigen große Abschnitte der IDX-1 Promotoren keine Sequenzhomologien.

Sequenzhomologien in Promotoren deuten darauf hin, dass sie wichtige regulatorische Elemente enthalten, die während der Evolution konserviert wurden. Diese Homologien beschränken sich zwischen Maus und Mensch hauptsächlich auf drei relativ kurze, stark homologe Regionen: PH 1: 2717-2536 (94%), PH2: 2404-2268 (81%), PH3: 1950-1670 (73%), sowie eine proximale homologe Region (73). Bis auf PH3 stimmen diese homologen Regionen mit den nukleasehypersensitiven Regionen HSS1 (2560-1880) und HSS3 (260 - +180) überein, die Wu *et al.* beschrieben haben (74). Transkriptionsaktive Bereiche des Genoms sind hypersensitiv gegenüber einem Verdau durch Nukleasen. Man nimmt an, dass diese Überempfindlichkeit gegenüber abbauenden Enzymen durch Bindung spezieller Regulatorproteine verursacht wird, welche die DNA leichter zugänglich machen. Es konnten zwei HNF-3 β Bindungsstellen nachgewiesen werden, die zu einer gewebsspezifischen Expression von IDX-1 in der Betazelle führen. In der Ratte wurde ein proximales so genanntes E-Box-Motiv charakterisiert, an das USF bindet (98). Sequenzhomologien zwischen Spezies deuten zwar auf wichtige Regulationselemente hin, schließen jedoch nicht aus, dass sich außerhalb dieser DNA-Regionen keine wichtigen Elemente befinden. Im humanen IDX-1 Promotor wurde ein betazellspezifisches Enhancerelement ohne Homologien zu anderen Spezies gefunden (99).

2. Grundlagen und Fragestellung

IDX-1 ist ein wichtiger Faktor für Pankreasentwicklung, Betazellneogenese und Zellproliferation. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ-2, bei dem man eine verringerte Expression von IDX-1 in Betazellen findet. Studien zur Regulation der IDX-1 Expression in Wachstumsmodellen könnten Hinweise für das Verständnis der Pathophysiologie des Diabetes mellitus geben und Ansätze für Prävention und Therapie aufzeigen.

Faktoren, die Betazellproliferation und Neogenese bewirken, sind unter anderen GLP-1 und Glukose. Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss dieser Faktoren auf die Expression von IDX-1 in Betazellen zu untersuchen.

Beeinflusst milde, vorübergehende Hyperglykämie die IDX-1 Expression, und wie erfolgt dies?

Glukose ist ein potenter Wachstumsreiz für Betazellen. Milde vorübergehende Hyperglykämie stimuliert in vivo und in vitro das Betazellwachstum. Physiologisch deutet diese auf einen erhöhten Insulin und Betazellbedarf des Organismus hin. Eine 48-stündige Glukoseinfusion verdoppelt die Betazellmasse in Ratten. Nach kurzen Glukosestimulationen (wenige Stunden) von Betazellen wurde bei IDX-1 eine Translokation in den Zellkern, eine Phosphorylierung und ein erhöhtes DNA-Bindungs- und Transaktivierungsvermögen beobachtet. Im Zellkern kommt es so zwar zu einer Konzentrationserhöhung von aktivem IDX-1, gesteigerte Expression oder ein erhöhter Proteingehalt wird aber kurzfristig nicht erzeugt. Daher wählten wir für unsere Experimente, die die IDX-1 Transkription untersuchen, eine Glukosestimulationszeit von 48 Stunden.

Die Definition einer milden Hyperglykämie in vitro ist äußerst schwierig, da sie von Zelllinie zu Zelllinie, abhängig von ihrer Sensitivität für Glukose, stark variiert. Dies sieht man bereits an den unterschiedlichen Glukosekonzentrationen der Standardnährmedien für Betazellen, die um mehr als 100 % variieren. Um einen physiologischen Konzentrationsbereich für INS-1

Zellen herauszufinden, orientierten wir uns an der Dosis- Wirkungskurve für die Insulinsekretion in INS-1 Zellen.

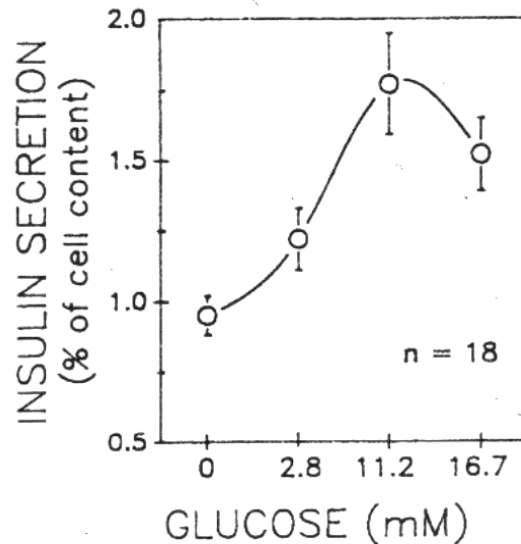


Abbildung 6: Der Graph zeigt die Dosis-Wirkungskurve von Glukose auf die Insulinsekretion in INS-1 Zellen. Die Insulinsekretion wurde als Anteil des Gesamtinsulingehalts der Zelle gemessen. Entnommen aus Asfari *et al.* (100).

Die Glukosekonzentration des normalen Kulturmediums für INS-1 Zellen liegt mit 11.2 mM bereits auf dem Scheitelpunkt der Dosis-Wirkungskurve für die Insulinsekretion. Bei dieser Konzentration ist eine Glukotoxizität für die Betazellen nicht auszuschließen. Für Versuche, bei denen eine Stimulation mit niedrigeren Glukosekonzentrationen als 11.2 mM durchgeführt wurde, erfolgte zuvor eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit der niedrigsten in der Versuchsreihe verwendeten Glukosekonzentration. Durch diese Präinkubation sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte nicht aus der Erholung von vorausgegangener Glukotoxizität resultieren.

Wird die Expression von IDX- 1 durch GLP-1 reguliert, und wie erfolgt dies? Auch für GLP-1 konnte gezeigt werden, dass es IDX-1 in klonalen Betazellen wie Glukose in den Nukleus transloziert und DNA-Bindungs- und Transaktivierungsaktivität am A1 Element des Ratten Insulin Promotors steigert. Auch eine Regulation der Genexpression wurde bereits postuliert.

Ziel dieses Teils der Arbeit ist es, den Einfluss von GLP-1 auf die IDX-1 Expression zu untersuchen, eine eventuelle Regulation des IDX-1 Promotors zu charakterisieren und GLP-1 responsive Promotorelemente zu lokalisieren.

Autoregulation

Das Protein IDX-1 spielt eine außerordentlich wichtige Rolle für die Erhaltung des Betazellphänotyps und Funktion der Betazelle. Im adulten Pankreas besteht eine enge Beziehung zwischen IDX-1 Expression und physiologischer Betazellfunktion. Ein Verlust an IDX-1 führt zur Betazelldysfunktion. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der Proinsulingenexpression und im Tiermodell zur Entwicklung eines Diabetes mellitus. Sowohl Faktoren die eine Verminderung der IDX-1 Expression bewirken (67, 68, 72-74), als auch Überexpression von IDX-1 beeinträchtigen die Proinsulingenexpression (31,101). Ein konstanter IDX-1 Gehalt scheint für die intakte Betazellfunktion wichtig zu sein. Es gibt Beobachtungen, die einen Feedbackmechanismus zur Regulation des IDX-1 Gehalts in Betazellen auf Promotorebene nahe legen (66). In einem System, in dem ein Doxycyclin gesteuertes *Antisense-Ribozyme* IDX-1 mRNA durch Spaltung eliminiert, kann die Expression von IDX-1 supprimiert werden. In Betazellen fällt auf, dass nach Anschalten des Systems IDX-1 mRNA und Protein zunächst abfallen, nach einiger Zeit jedoch auf ihr Ausgangsniveau zurückkehren oder sogar darüber hinaus ansteigen (66).

Gibt es Anhaltspunkte für eine Autoregulation des IDX-1 Promotors?

Ziel dieses Teils der Arbeit ist es, zu untersuchen, ob exogene Beeinflussung des IDX-1 Gehalts in Betazellen einen Einfluss auf die IDX-1 Promotoraktivität hat. Dies soll einerseits durch Reduzierung des IDX-1 Gehalts mit dem *Antisense-Ribozyme* System und andererseits durch transgene Überexpression untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräteliste

Agarosegelelektrophoresesystem	Bio-Rad, Wide Sub Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Angeschlossen an	Virtis Freezemobile 12SL	The Virtis Co., Inc., Gardiner, NY, USA
Bakterien Hood	Baker B60-112	The Baker Co., Sanford, ME, USA
Bakterien Inkubatoren	New Brunswick Series 25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA
CO ₂ Inkubatoren	Hotpack 351920	Hotpack, Philadelphia, PA, USA
Filmentwickler	Kodak X-OMAT M20 Processor	Marconi Medical Systems, Inc., Walpole, MA, USA
Geldarstellungssystem	IS-1000 Digital Imaging System Version 2.0	Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA
Gelelektrophorese	Hoefler Scientific SE 600	San Francisco, CA, USA
Geltrockner	Bio-Rad Dual Temperature Slab Gel Dryer, Model 1125B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glukosemessgerät	YSI 2300 STAT glucose analyzer	Yellow Springs Instrument Co.Inc., Yellow Springs, OH, USA
Hybridisierungsöfen	Napco Model 5831 Vacuum Oven	Napco, Winchester, VA, USA

Material und Methoden

Luminometer	AutoLumat LB 953	EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Zeiss IM 35	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Scanner	Fluor Imager 575	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Szintillationszähler	Beckman Model LS 3801 Liquid Scintillation Counter	Beckman Instr., Fullerton, CA, USA
Spectrophotometer	Beckman Model DU-64	Beckman Instr., Fullerton, CA, USA
Speed Vac	Savant Speed Vac Concentrator Model SVC100H-115	Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, USA
Thermocycler	GeneAmp 9600 PCR System	Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA, USA
UV Crosslinker	Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
UV Transilluminator	Foto/Prep I	Fotodyne, Inc., Hartland, WI, USA
Waagen	Mettler PE 3600 und AE 160	Mettler Instrument Corp., Highstown, NJ, USA
Zellkulturhoods	Steril GARD VBM-600 Steril GARD VBM-400	The Baker Co., Sanford, ME, USA
Zentrifugen	Beckman J2-21M Induction Beckman Accu Spin Beckman L8-80M, Ultrazentrifuge	Beckman Instr., Fullerton, CA, USA Beckman Instr., Fullerton, CA, USA Beckman Instr., Fullerton, CA, USA

	IEC Micromax	International Equipment, Needham Heights, MA, USA
--	--------------	--

Abbildung 7: Geräteliste

3.1.2. Reagenzien

DNA-Modifizierende Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von Promega Madison, WI, USA gekauft. Alle übrigen Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, von SIGMA St. Louis, MO, USA. Oligonukleotidsynthese und Sequenzierungen wurden von einer Einrichtung ausserhalb des Labors durchgeführt.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Zellen

Als Betazellmodell verwendeten wir die klonalen Betazelllinien INS-1 und MIN6. INS-1 Zellen (100) stammen von Dr. Claes B. Wollheim (Genf, Schweiz).

INS-1 Zellen wurden aus strahleninduzierten, transplantierbaren Ratteninsulinomen gewonnen. Sie wurden im Kulturmedium RPMI 1640 mit 11.2 mM Glukose, 0.0005% β -Mercaptoethanol, 1 mM Natrium Pyruvat, 10 mM HEPES, 1% Antimycotic/Antibiotic (alle von Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) und 10 % fötalem bovinen Serum (OMEGA scientific, Trazana, CA, USA) kultiviert. Das fötale bovine Serum (FBS) wurde zuvor bei 60°C 30 Minuten lang hitzeinaktiviert. INS-1 Zellen wurden alle sieben Tage 1→10-12 passagiert. Für die gezeigten Versuche wurden INS-1 Zellen der Passagen p106-117 benutzt.

MIN6 Zellen (102) stammen von J. Miyazaki (Osaka University Medical School, Osaka, Japan). MIN6 Zellen wurden aus Insulinomen gewonnen, die durch gezielte Expression des Simian Virus 40 T Antigen Gens in transgenen Mäusen induziert wurden.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) mit 4500 mg/l Glukose (25 mM), 1% PSA (100 U/ml Penicillin G Sodium, 100 µg/ml Streptomycin Sulfate, 0.25 µg/ml Amphotericin B (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 10% hitzeinaktiviertem FBS, 0.0005% β-Mercaptoethanol (5 µl/l), kultiviert. MIN6 Zellen wurden alle sieben Tage 1→6-8 passagiert. Für die gezeigten Versuche wurden die Passagen p23-26 benutzt.

3.2.2. Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 37°C in einer 5% CO₂, 95% Luftatmosphäre mit 90% relativer Feuchtigkeit in 100 mm Zellkulturschalen (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) gehalten. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage erneuert. Zum passagieren wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1 ml Trypsin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) gespült, in einem weiteren ml von der Kulturschale abgelöst und in 10 ml Medium transferiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, in frischem Medium resuspendiert und in neue Kulturschalen überführt.

3.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die fast konfluenten Zellen in 100 mm Kulturschalen trypsinisiert und durch Zentrifugation gesammelt. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit 20% FBS resuspendiert, auf Eis mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt und in 1.8 ml Cryotubes (Nunc, Inc., Naperville, IL) bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Cryotubes in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell in der Hand erwärmt und in 10 ml Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, in 10 ml 37°C warmen Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausplattiert.

3.2.4. Transfektionen

Transientes Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen bezeichnet man als transiente Transfektion. Die verwendeten Plasmide enthalten dabei keinen Selektionsmarker und werden nach einigen Tagen ausgestoßen. Expression

der transfizierten Gene lässt sich 24-96 Stunden nach der Transfektion analysieren. Transfektionen wurden mit liposomalem DNA Transfer durchgeführt. (Lipofectamine, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD)

Bei diesem Verfahren bilden sich Liposomen-DNA-Komplexe, welche präzipitieren, sich auf der Membran der Zellen ablagern und aufgenommen werden. Die Zellen wurden geteilt, in 60 mm Zellkulturschalen überführt und nach 24 Stunden transfiziert. Das Lipofectamine-Plasmid-Gemisch bestand aus 5 µg DNA und 10 µl Lipofectamine pro Schale. DNA und Lipofectamine wurden in je 0.3 ml serumfreiem Medium 45 Minuten getrennt inkubiert, gemischt und weitere 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit serumfreiem Medium auf 3 ml aufgefüllt und für fünf Stunden auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden in normalem Kulturmedium oder den im Versuch angegebenen Medien inkubiert.

Die Transfektionseffizienz in INS-1 Zellen lag bei Stichproben mit pCMV-GFP bei ca. 20%. Hierbei exprimieren transfizierte Zellen das durch Fluoreszenz leicht nachweisbare Green Fluorescent Protein (GFP).

3.2.5. Zellernte

Zur Zellernte wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und dann in 0.5 ml 1x Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) lysiert. Ein Teil des so erhaltenen Ganzzellysats wurde für Western Blots verwendet und auf Trockeneis eingefroren. Der restliche Teil des Ganzzellysats wurde fünf Minuten bei 14000 rpm (ICE Micromax) zentrifugiert und der Überstand für Luziferasereporterassays verwendet.

3.2.6. Glukosestimulation

Für Glukosestimulationen wurde das oben beschriebene Medium ohne Glukose angesetzt und Glukose nachträglich bis auf die im Versuch angegebene Konzentration zugegeben. Den Stimulationen ging stets eine 24 stündige Präinkubation bei der niedrigsten im Versuch verwendeten Glukosekonzentration voraus.

3.2.7. GLP-1-Stimulation

Das für die Versuche verwendete humane GLP-1 (7-36amid) (BIONEbraska, Inc., Lincoln, NE, USA) wurde in H₂O gelöst und als 1 µM Lösung bei -80°C aufbewahrt. Erst unmittelbar vor der Anwendung wurde GLP-1 im Behandlungsmedium auf 10 nM verdünnt. Dieses besteht aus dem Kulturmedium RPMI 1640 ohne Glukose, 0.0005% β-Mercaptoethanol, 1 mM Natrium Pyruvat, 10 mM HEPES, 1% Antimycotic/Antibiotic (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) und 1% humanem Serum Albumin, 1% Aprotinin (Roche Diagnostics Corp. Indianapolis, IN, USA) und der angegebenen Menge Glukose.

3.3. Reporteragenassays

Reporteragenassays dienen der Analyse der Genexpression, sowie regulatorischer Elemente in Promotoren. Das Reporteragen wird unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt, und zeigt dessen Aktivität an. Es gibt viele verschiedene Reporteragensysteme mit leicht nachweisbaren Genprodukten, wie LacZ, CAT und Luziferase. Beim Luziferaseassay wird das Luziferasegen des nordamerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* als Reporter exprimiert, dessen Genprodukt sich durch Biolumineszenz nachweisen lässt. Verwendet man den kompletten Promotor eines Gens mit allen regulatorischen Elementen um einen Reporter zu treiben, entspricht das Signal des Assays der mRNA Produktion und ist somit eine Alternative zum quantitativen mRNA Nachweis mittels Northern Blot oder RT-PCR. Die Wahl des Reportersystems ist abhängig von der erwarteten Kinetik der untersuchten Regulation. Luziferase, mit einer sehr kurzen Halbwertszeit, vermittelt eher eine Momentaufnahme der Genexpression, während CAT mit einer langen HWZ auch vorübergehende Veränderungen, die sich wieder zurückbilden, darstellen kann. Ein weiterer wichtiger Einsatzbereich für Reporteragenassays ist die funktionelle Analyse von Promotoren. Hierzu verwendet man nur Teile des Promotors zur Steuerung des Reporteragens. Zusätzlich kann man durch Mutation und Deletion regulatorische Sequenzen identifizieren und deren Funktion charakterisieren.

3.3.1. Luziferaseassays

Luziferaseassays wurden mit dem Luziferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) im AutoLumat LB953 mit 10 µl Lysat und einer Messzeit von 10 Sekunden durchgeführt. Proteinkonzentrationen der Zellextrakte wurden bestimmt und alle Luziferaseaktivitäten in Lichteinheiten pro µg Protein angegeben.

3.4. Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay, einem Bradfordassay, im Bio-Rad SmartSpec Spektrometer ermittelt (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Lösungen von bovinem Serum Albumin (BSA) der Konzentrationen 0.2/0.5/1/2/5/10 mg/ml verwendet.

3.5. DNA und RNA Konzentrationen

DNA und RNA Konzentrationen wurden mit dem Bio-Rad SmartSpec Spektrometer (Bio-Rad, Hercules; CA) durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm (OD 260/280) ermittelt.

3.6. Glukose Messungen

Für die Glukosemessungen im Medium wurden zu den im Versuch angegebenen Zeiten 50 µl Medium aus dem Überstand der Zellkultur entnommen, eventuell enthaltene Zellen abzentrifugiert und der Überstand eingefroren. Die Messung wurde mit dem YSI 2300 STAT *glucose analyzer* (Yellow Springs Instrument Co.Inc., Yellow Springs, OH, USA) mithilfe der Glukoseoxidase Reaktion durchgeführt. Dabei oxidiert das Enzym Glukoseoxidase D-Glukose unter Bildung von Wasserstoffperoxyd zu Glukonolacton. Durch Oxidation des entstandenen Wasserstoffperoxyds an einer Platinelektrode des Messgeräts wird ein Strom erzeugt, der proportional zum eingesetzten Substrat, also der D-Glukose, ist.

3.7. Plasmide

pCMV4 IDX-1 Expressionsplasmid (66)

pBS-pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pGL3-Basic (Promega, Madison, WI, USA)

3.8. Plasmidkarten

3.8.1. Maus IDX-1 Promotor-Reporterplasmide

Das -4500 mIDXluc Reporterplasmid wurde durch Klonierung eines von Stoffers *et al.* beschriebenen 4.6kb Maus IDX-1 Promotorfragments in die gebluntete HindIII Restriktionsstelle des pGL3-Basic Vectors konstruiert (50).

(Gene bank Accession number: AF192495.1 Mus musculus PDX-1 gene, 5' flanking region)

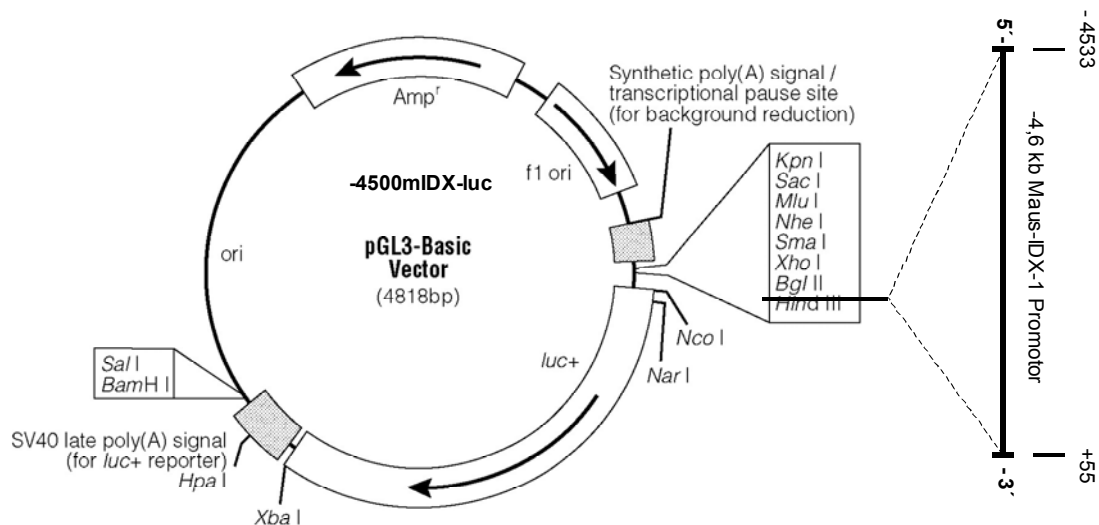


Abbildung 8: -4500mIDXluc-Reporterplasmid

Reporterplasmide mit schrittweisen 5'-Deletionen des Maus IDX-1 Promotors wurden von C. Miller und J.Seufert entsprechend **Abbildung 9** konstruiert.

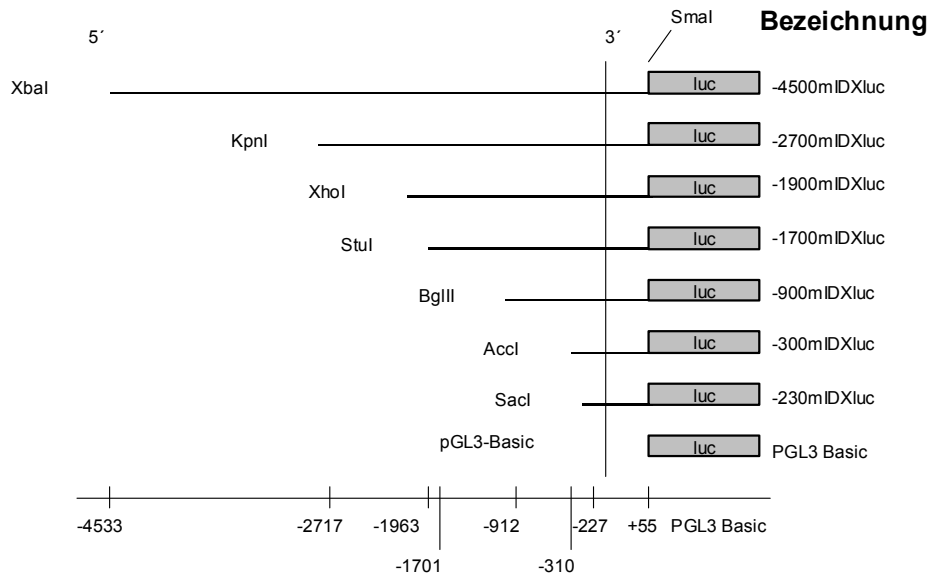


Abbildung 9: Klonierungsstrategie der sukzessiven 5'-Deletionskonstrukte des Maus IDX-1 Promotors im pGL3 Basic Vector.

3.8.2. SKluc-Plasmide

Das -230mIDX Promotorfragment wurde mit SacI und XmaI aus mIDX 4.6CAT (C. Miller) ausgeschnitten, und direktional in die PBSIIS-Polylinkerregion von SKluc ligiert. Die Identität des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.8.3. Ratten Insulin Promotor I

Der -410 rINS1-LUC enthält 410 Basenpaare 5' des Ratteninsulins I im Luziferasereportervektor pxp2-Basic (103).

3.9. Bakterien Transformation

Die Plasmide wurden in *E.coli*, Stamm JM109 (Promega, Madison, WI, USA) amplifiziert.

Plasmide wurden durch Hitzeschocktransformation in die Bakterien eingebracht. 50 µl hitzekompetente *E.coli* wurden auf Eis 30 Minuten mit etwa 100 ng Plasmid DNA inkubiert, für 90 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad erhitzt und zwei Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 200µl

vorgewärmtes LB Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10. Plasmid Maxiprep

Für transiente Transfektionen benötigt man große Mengen sehr reiner Plasmid DNA. Um diese zu gewinnen, wird das gewünschte Plasmid unter dem Selektionsdruck eines Antibiotikums in *E. coli* vermehrt und isoliert. Die gewünschte Plasmid DNA ist überspiralisiert und kleiner als chromosomale bakterielle DNA oder beschädigte Plasmide und lässt sich so physikalisch isolieren. Die DNA Isolation besteht aus folgenden Schritten:

Die Bakterien werden lysiert und die Zelltrümmer mit bakteriellen Chromosomen abzentrifugiert. Das klare Lysat enthält neben der Plasmid DNA auch Fragmente bakterieller chromosomaler DNA, RNA und Proteine. DNA und RNA werden mit Isopropanol auf Trockeneis ausgefällt. Die Auftrennung erfolgt durch Ultrazentrifugation über 20 Stunden in einer CsCl-Lösung. Dabei bildet sich ein Dichtegradient der die DNA Spezies auftrennt. DNA wird durch die interkalierende rote Substanz Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht, sodass man sie mit einer Spritze entnehmen kann (**Abbildung 10**).

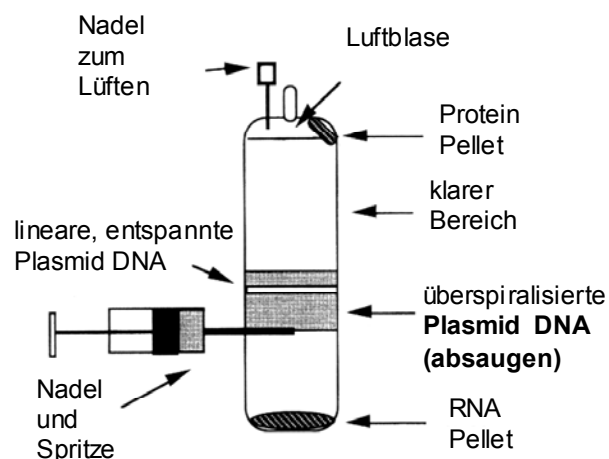


Abbildung 10: Dichtegradient nach CsCl- Ultrazentrifugation. Reine überspiralisierte Plasmid-DNA kann isoliert abgesaugt werden.

Durch Extraktion mit n-Butanol wird das EtBr entfernt, eine anschließende Dialyse beseitigt das noch enthaltene CsCl.

3.10.1. Protokoll:

Die Bakterien wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Eine 5 ml Starterkultur wurde mit einer isolierten Bakterienkolonie beimpft und nach acht Stunden in eine 1 Liter Kultur überführt, welche über Nacht inkubiert wurde. Die Bakterien aus der Übernachtskultur wurden durch fünfminütige Zentrifugation mit 5000 rpm bei 4°C (Beckman J2-21M, JA-14 Rotor) als Pellet gewonnen. Das in 36 ml Lösung I resuspendierte Pellet wurde mit 2 mg/ml Lysozym versetzt und nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf Eis mit 80 ml Lösung II vermischt. Nach fünf Minuten wurden 40 ml Lösung III zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Die ausgefallenen Zelltrümmer wurden 20 Minuten mit 10000 rpm bei 4°C abzentrifugiert (Beckman J2-21M, JA-14 Rotor) und der durch ein Leintuch filtrierte Überstand mit dem 0.6-fachen Volumen Isopropanol versetzt. Die DNA wurde während einer Stunde bei -80°C präzipitiert und durch zehnminütige Zentrifugation mit 10000 rpm bei 4°C (Beckman J2-21M, JA-14 Rotor) gesammelt. Das Pellet wurde in 0.5 ml 1M Tris HCl, pH 7.9 und 10,5 ml TE gelöst, mit 11 g CsCl versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation mit 10.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C (Beckman J2-21M, JA-20 Rotor) bildete sich ein RNA und Proteinpellet, das verworfen wurde. Der Überstand wurde, mit 2 mg EtBr versetzt, in einem Ultrazentrifugenröhrchen eingeschweißt und 20 Stunden mit 55000 rpm bei 20°C zentrifugiert (Beckman L8-80M Ultrazentrifuge, 70.1 TI Rotor). Bei der Ultrazentrifugation bildete sich ein CsCl-Dichtegradient aus, in dem sich ethidiumbromidgefärbte Banden von überspiralisierter Plasmid-DNA und entspannter oder linearer Plasmid-DNA abgrenzen ließen. Die überspiralisierte DNA wurde, wie in Abbildung gezeigt, mit Spritze und Nadel abgesaugt. Das EtBr, das sich gut in organischen Lösungsmitteln löst, wurde durch Ausschütteln mit gleichem Volumen n-Butanol extrahiert. Zentrifugation bei 2000 rpm für eine Minute führte zur Phasentrennung. Die vom n-Butanol gebildete obere Phase wurde verworfen und der Vorgang bis zur vollständigen Entfärbung der Lösung ca. sechsmal wiederholt. Anschließend wurde die Lösung dreimal für vier Stunden gegen 4

Liter TE dialysiert. Die Identität der isolierten Plasmide wurde durch Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese überprüft.

Reagenzien

TE: 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.8 in dH₂O

1 M Tris-HCl: 121 g Tris, auf 1 l dH₂O, mit HCl auf pH 7.9 einstellen

Lösung I: 50 mM D-Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 7.9 in dH₂O

Lösung II: 1% SDS, 0.2 M NaOH in dH₂O

Lösung III: 3 M K-Acetat pH 4.8 (60 ml 5M KAcO, 57.5 ml Eisessig, 142.5 ml dH₂O)

LB-Medium: 10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, (Difco, Detroit, MI, USA) 5 g/l NaCl, dH₂O mit 5 M NaOH auf pH 7.0 einstellen. Autoklavieren und nach Abkühlung auf 55°C 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zugeben.

3.11. Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen und quantitativen Nachweis von Proteinen. Die im Zellextrakt enthaltenen Proteine werden zunächst auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) nach Molekulargewicht aufgetrennt (104). Danach werden die Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und sind so für Antikörper zugänglich. Der Blot wird mit einem spezifischen, ersten Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an ein Enzym gekoppelt ist, kann man dann das Protein nachweisen. Das Enzym, wie z. B. Horseradish Peroxidase, katalysiert eine Nachweisreaktion, die den Antikörper-Proteinkomplex sichtbar macht.

3.11.1. Protokoll

Von jeder Probe wurden 25 µg Protein aus Ganzzelllysat mit 5 x Sample Loading Buffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Hoefer Scientific SE 600). Proteine aus dem Gel wurden im Sandwichverfahren elektrophoretisch (4 Stunden mit 0.25 A bei 4°C) auf eine

Nitrozellulosemembran transferiert (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Die Membran wurde eine Stunde in Blocking Puffer geblockt, 3 x 15/5/5 Minuten mit PBS/Tween gewaschen, eine Stunde mit dem ersten Antikörper inkubiert (1:10.000 verdünntes polyklonales Kaninchenantiserum Hm 253). Hm 253, Rabbit anti IDX-1, C-terminal ist gegen die 16 letzten Aminosäuren des C-Terminus von IDX-1 gerichtet (Peptid Epitop SPQPSSIAPLRPQEPR) (105).

Der Blot wurde dreimal für 15/5/5 Minuten mit PBS/Tween /RIPA gewaschen und für eine Stunde mit einem in PBS/Tween /RIPA 1:10.000 verdünnten Horseradish Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. (Goat anti rabbit IgG, Horseradish Peroxidase Conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) Nach weiteren drei Waschschritten für 15/5/5 Minuten mit PBS/Tween/RIPA wurde der Blot mittels ECL Autolumineszenzsystem (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA) dargestellt und der Film belichtet. Als Größenmarker wurden High und Low Molecular Weight Prestained Protein Standards verwendet (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

3.11.2. Reagenzien

Polyacrylamidgel

	Running Gel 10%	Stacking Gel
30% Acryl. (Protogel)	20 ml	2.66 ml
4x Running Puffer	15 ml	
4x Stacking Puffer		5 ml
10 % SDS	600 µl	200 µl
H ₂ O	24.1 ml	12.2 ml
APS	300 µl	100 µl
Temed	20 µl	10 µl

4x Running Gel Puffer: 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8

4x Stacking Puffer: 0.5 M Tris-Cl, pH 6.8

5x Sample loading Puffer: 4ml 10% SDS, 2ml Glycerol, 2.4 ml 0.5 M Tris-Cl pH 6.8, 0.0002 g Bromphenol Blau, mit dH₂O auf 19 ml auffüllen, 1ml β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben 25 µl auf 500 µl)

PBS (Phosphate Buffered Saline): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂HPO₄, auf 1 l mit dH₂O auffüllen und mit HCl auf pH 7.4 einstellen

PBS Tween: 4ml Tween 20, auf 2 l PBS

Blocking Puffer: 18 g fettfreie Trockenmilch, auf 200 ml PBS Tween

RIPA Buffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5 % Deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM NaF, auf 1 l dH₂O

PBS/Tween RIPA: 50% RIPA Buffer, 50% PBS /Tween

3.12. Northern RNA Blots

Der Northern Blot dient dem spezifischen und quantitativen Nachweis von RNA. RNA wird auf einem Agarosegel nach Größe aufgetrennt und durch Kapillarfluss auf eine Membran übertragen. Da RNA sehr anfällig für abbauende Enzyme (RNAasen) ist, die praktisch überall am Menschen vorkommen (Haut, Haare), muss mit besonderer Vorsicht gearbeitet werden. Die RNA wird auf der Membran durch Hitze und UV-Strahlung fixiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen. Als Sonde eignet sich sowohl mRNA, cDNA als auch synthetische Oligonukleotide aus dem nachzuweisenden Gen.

3.12.1. Protokoll

Gesamt RNA wurde nach der von Chomczynski und Sacchi (106) entwickelten Methode gewonnen. Etwa 70% konfluente INS-1 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen, in 3 ml Tri-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) lysiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten wurde der Überstand in 1ml Portionen in neue Eppendorftubes überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach starkem Schütteln für 15 Sekunden und Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit wurde die klare, obere Phase in ein frisches Eppendorftube überführt. Die RNA wurde mit 750 µl Isopropanol gefällt und durch erneute Zentrifugation als Pellet gesammelt. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol/DEPC- H₂O gewaschen, in 50 µl DEPC- H₂O gelöst und bei -80°C gelagert. Von jeder Probe wurden 4 µg RNA

hitzenaturiert und elektrophoretisch auf einem Formaldehyd/Agarosegel aufgetrennt. Die Banden von 18S und 28S RNA wurden mit EtBr unter UV Licht dargestellt und als Ladungskontrolle herangezogen.

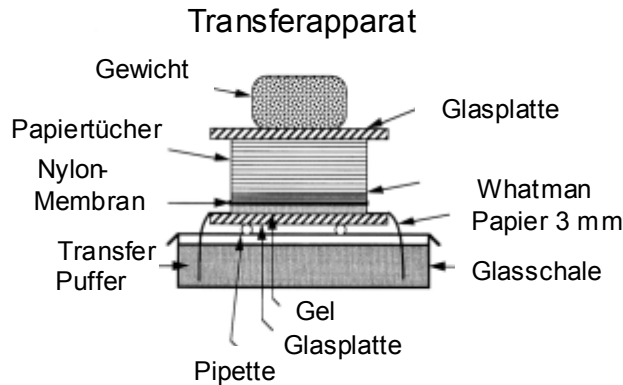


Abbildung 11: Aufbau des Northern RNA Blots. Nach dem Kapillarflussprinzip wird der Transferpuffer durch das Gel in einen Stapel Papiertücher gesaugt. Dabei wird RNA aus dem Gel auf die darüberliegende Membran geblottet.

Über Nacht wurde die RNA in einem Transferapparat nach dem Kapillarflussprinzip auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) und mit UV Licht durch Quervernetzung fixiert. (Auto Stratalink, UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Es folgte Prähybridisierung mit 5 ml Rapid-Hyb Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) bei 45°C für 30 Minuten und Hybridisierung für 4 Stunden bei 50°C unter Zugabe von 7.000.000 cpm [α -32P]-dATP markierter IDX-1 Probe (RadPrime DNA Labeling System Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Als Probe diente ein 1.3 kB NotI/NcoI Fragment der Ratten IDX-1 cDNA aus dem Expressionsvektor pBJ5-IDX-1 (32).

Anschließend wurde der Blot 15 mal in SSC absteigender Konzentrationen (SSC 5 x - 0.1 x) und 0.1% SDS gewaschen, und einem Röntgenfilm für sechs Stunden bei -80°C zur Belichtung ausgesetzt.

3.12.2. Reagenzien

Gel: 1% Formaldehyd, 1.2% Agarose, 1x MOPS

20x MOPS: 0,4 M MOPS, pH 7.0, 0.16 M NaOAc, 20 mM EDTA

20x SSC: 1l 175.3 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat, pH 7.0

Formaldehyd Gel Loading Puffer: 720 µl Formamid, 80 µl 20x MOPS, 260 µl 37% Formaldehyd, 180 µl DEPC H₂O, 100 µl EtBr (10 mg/ml), 80 µl Glycerol, 80 µl gesättigtes Bromphenol Blau in DEPC-H₂O

DEPC- H₂O: 0.1 % DEPC in H₂O autoklavieren.

Transfer Puffer: 10x SSC

Gel Running Puffer: 1x MOPS

3.13. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA ist ein Verfahren, um Proteinbindung von DNA nachzuweisen. Dies können beispielsweise Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in Promotoren sein. Radioaktiv markierte dsDNA Fragmente von ca. 50 bp werden mit Zellkernproteinen inkubiert und über ein nichtdenaturierendes Gel aufgetrennt. Bindet ein Protein an die DNA kommt es zur Erhöhung der Masse des Komplexes und somit zur Verschiebung (Shift) der Bande. Aus der Stärke der so erzeugten neuen Bande kann man auf die Bindungsaffinität des DNA-Bindungsproteins schließen, und verschiedene Zelltypen oder stimulierte mit nicht stimulierten Zellen vergleichen.

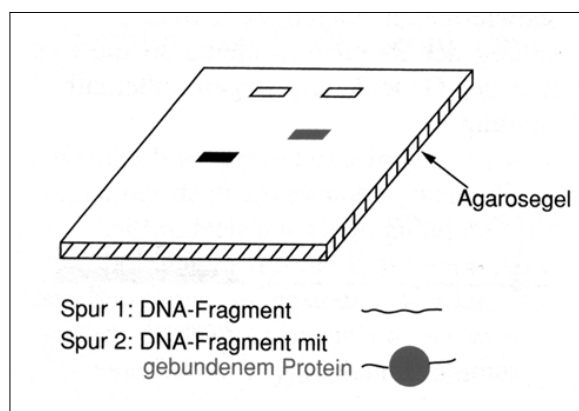


Abbildung 12: Schema eines *Electrophoretic Mobility Shift Assay* modifiziert nach Brown (107).

Das DNA-bindende Protein kann mit Hilfe von Antikörpern identifiziert werden. Ein spezifisches Antiserum führt zu einer Massenerhöhung des DNA-Protein-Antikörper Komplexes und zu einem weiteren Verschieben der Bande (Supershift). Als Probe wurden sechs überlappende doppelsträngige

Oligonukleotide von ca. 60 bp Länge und überhängenden Enden synthetisiert, welche die -230 Region des mIDX-1 Promotors abdecken. Die überhängenden Enden wurden mit Klenow Polymerase mit [α - 32 P]-dATP aufgefüllt. (Du Pont NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)

3.13.1. Herstellung der radioaktiv markierten Probe

Oligonukleotide (10 pmol/ μ l)	1 μ l
10x Klenow Puffer	2 μ l
dCTP, dGTP, and dTTP, je 2.5 mM	1 μ l
[α - 32 P]-dATP (10 μ Ci/ μ l)	5 μ l
Klenow Polymerase (2 U/ μ l, Promega)	1 μ l
dH ₂ O	ad 20 μ l

Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden in Sephadex-25 Quick Spin Columns (Roche Diagnostics Corp. Indianapolis, IN, USA) von nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt.

3.13.2. Reaktionsansatz

Es wurden je 4 μ l 5 x GDB, 1 μ g Protein aus Kernextrakten in 10 μ l Puffer D, 4 μ l dH₂O, 2 μ l (2 μ g) poly dIdC und 1 μ l Probe (20.000 cpm) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze mit 4 μ l 20% Glycerol versetzt und auf einem 5%igen TBE Acrylamidgel (Accugel 38:2 acryl:bis, National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) in einer Gelkammer aufgetrennt.

Dem auf 3 mm Whatmanpapier getrockneten Gel wurde ein Röntgenfilm für 12-24 h bei -80°C zur Belichtung aufgelegt.

3.13.3. Supershifts

Für Supershifts wurde dem oben beschriebenen Reaktionsansatz vor Zugabe von poly dIdC und Probe 1 μ l Antiserum zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.13.4. Reagenzien

Antiseren gegen USF-1 und USF-2 (nicht kreuzreaktiv): USF-1 (C-20) sc-229, USF-2 (C-20) sc-862.

Antiseren gegen c-myc und n-myc (nicht kreuzreaktiv): c-myc (N-262) sc-764, n-myc (C-19) sc-791.

Antiserum gegen SREBP-1: SREBP-1 (H-160) sc-8984. Diese Antiseren wurden als TransCruz Gel Supershiftreagentien bezogen. (SANTA Cruz Biotechnologies Santa Cruz, CA, USA)

5x GDB (Gel delay Puffer): 100 mM KP, pH 7.9, 1 mM EDTA, 5 mM DTT
100 mM (Kalium Phosphat Puffer): 92.4 ml of 0.1M K₂HPO₄, 7.6 ml of 0.1M KH₂PO₄

Poly-(dIdC): (poly dIdC) bulk carrier DNA auf 1 µg/µl in dH₂O verdünnt

Dignam Puffer D: 20 mM HEPES pH 7.9, 20 % Glycerol, 100 mM KCL, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT

5x TBE: 54g Tris, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8, dH₂O auf 1 Liter

3.14. Kernextrakt Miniprep aus Zellkulturen

nach Schreiber *et al.* (108).

Etwa 70% konfluente INS-1 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 1 ml PBS von den Platten geschabt und in 1.5 ml Eppendorftubes durch Zentrifugation (10.000 rpm, 15 Sekunden) gesammelt. Das Zellpellet wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert und 30 Minuten auf Eis anschwellen gelassen. Nach Zugabe von 25 µl 1% NP-40 Lösung wurde zehn Sekunden auf dem Vortex gemischt und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthält Membranen und Zellkerne, der Überstand enthält die Bestandteile des Zytosols und kann aufgehoben werden.

Das Pellet wurde mit 50 µl eiskaltem Puffer C versetzt und für 30 Minuten zum Mischen bei halbmaximaler Geschwindigkeit in die Schüttelplattform des Vortex gegeben. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 14000 rpm enthält der Überstand die Kernproteine und wird auf Trockeneis eingefroren.

3.14.1. Reagenzien

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF

Puffer C: 20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF

1% NP-40 (IGEPAL) in dH₂O

3.15. Mutational Cloning

Mutationen im Maus IDX-1 Promotor wurden mittels des Quickchange[®] Mutagenesis Systems eingefügt (Stratagene, La Jolla, CA). Als mutationentragende Primer wurden die Oligonukleotide der E-Boxmutanten EM1 und EM2 verwendet (**Abbildung 23**).

3.16. Statistische Analyse

P values wurden durch den Student's *t* test ermittelt (Microsoft Excel; Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) Signifikanzniveaus von $p < 0.01$ wurden als (**) gekennzeichnet, $p < 0.05$ als (*) Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean) an.

4. Ergebnisse

4.1. Regulation der IDX-1 Expression durch Glukose in Betazellen des endokrinen Pankreas

Um die Regulation der IDX-1 Expression durch Glukose zu untersuchen, führten wir einen Proteinnachweis von IDX-1 in glukosestimulierten INS-1 Zellen durch. Im Western Blot beobachteten wir, dass der IDX-1 Protein Gehalt in INS-1 Zellen in einem physiologischen Bereich durch Glukose reguliert wird. Nach einer Vorinkubation über 24 Stunden mit 0.5 mM Glukose wurden die Zellen mit der angegebenen Glukosekonzentration von 0.5 mM bis 11.2 mM für weitere 48 Stunden inkubiert. Die Western Blots wurden mit Ganzzellextrakten angefertigt und zeigen daher einen absoluten Anstieg der Proteinexpression. Im Northern Blot konnte beobachtet werden, dass auch der IDX-1 mRNA Gehalt im gleichen Versuchsaufbau mit steigender Glukosekonzentration zunimmt. Dies deutet auf einen transkriptionellen Effekt der Glukosestimulation auf die IDX-1 Expression hin.

4.1.1. IDX-1 Western Blot

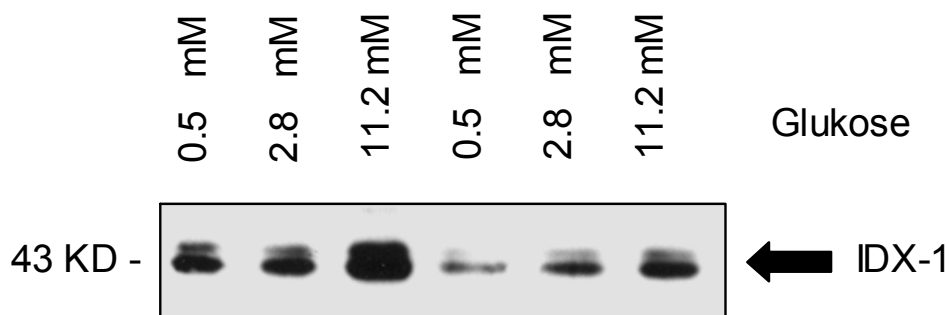


Abbildung 13: IDX-1 Western Blot. Protein aus INS-1 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit den angegebenen Glukosekonzentrationen. Es wurden gleiche Mengen Protein auf jede Bahn geladen. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente mit Zellen der Passagen P 107 und 117. Die IDX-1 Expression wird durch Glukose stimuliert.

4.1.2. Northern Blot

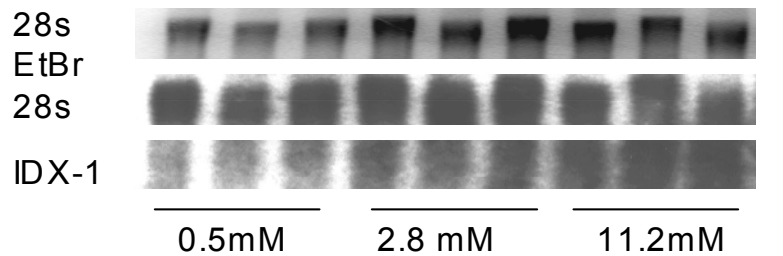


Abbildung 14: Northern RNA Blot aus INS-1 Zellen nach Glukoseinkubation über 48 Stunden. Banden: Oben: EtBr gefärbte 28s Bande auf dem Gel. Mitte/Unten: Autoradiogramm. Glukose stimuliert die Bildung von IDX-1 mRNA.

4.1.3. IDX-1 Promotorregulation

Um die Aktivierung der IDX-1 Transkription zu untersuchen, fertigten wir Reporterassays mit dem -4500 bp Maus IDX-1 Promotor an. Die Aktivität dieses Promotors spiegelt die Expression von IDX-1 während der Entwicklung zeitlich und örtlich zuverlässig wider und enthält somit alle wichtigen regulatorischen Elemente (50). Glukosestimulation aktiviert den IDX-1 Promotor im -4500mlDXluc Reporter maximal dreifach (Abbildung 15). In einzelnen Versuchen stellte sich heraus, dass eine Stimulationsdauer von 48 Stunden, verglichen mit kürzeren Stimulationszeiten, zu einer maximalen Aktivierung führt.

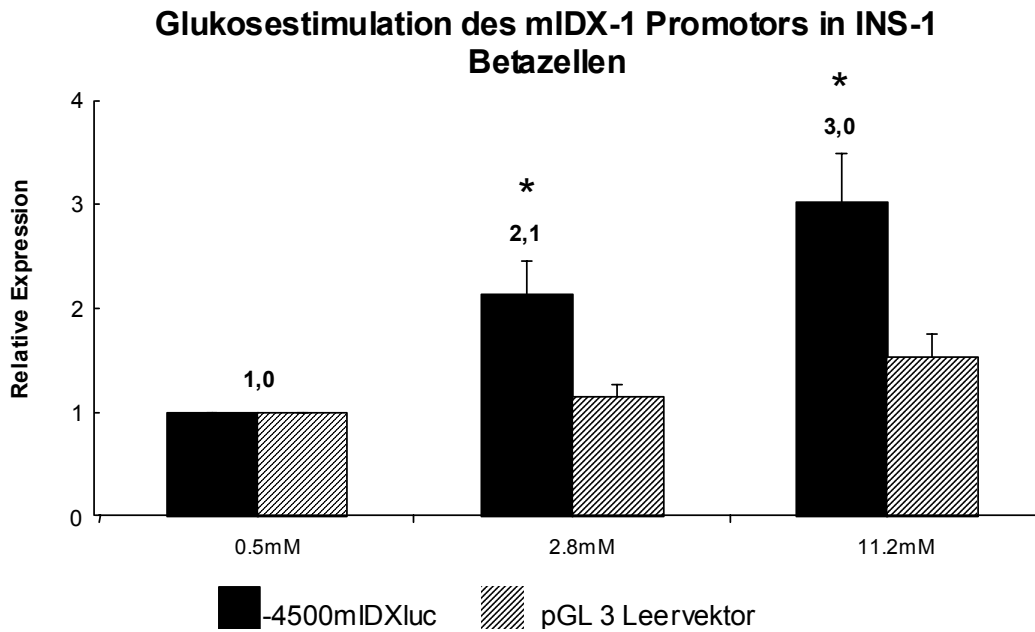


Abbildung 15: Aktivität des -4500mIDX Promotors in Abhängigkeit von Glukose in INS-1 Betazellen. INS-1 Zellen wurden mit 0.5µg -4500mIDXluc Reporterplasmid bzw. pGL3 Leervektor (gestreift) transfiziert und für 48 Stunden bei den angegebenen Glukosekonzentrationen inkubiert. Die relative Expression, pro mg Protein im Zellextrakt, bezogen auf 0.5 mM aus 3 Experimenten wurden gemittelt. * $p < 0,05$. Glukose stimuliert die IDX-1 Promotor Aktivität.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass vorübergehende, leichte Hyperglykämie über eine IDX-1 Promotoraktivierung zu einem Anstieg von IDX-1 in INS-1 Betazellen führt.

4.1.4. Glukosekonzentrationen im Kulturmedium

Der stimulierende Faktor in den durchgeführten Experimenten ist Glukose. In welchem Maße Glukose während der Inkubation von den Zellen verbraucht wird, ist bisher unklar. Um Effekte durch abnehmende Glukosekonzentrationen während des Versuchs auszuschließen, führten wir eine Messung der Glukosekonzentration im Medium über einen Zeitraum von 72 Stunden durch. Es konnte gezeigt werden, dass die Glukosekonzentration während der Inkubation weitgehend konstant bleibt. Nach 48 Stunden beträgt die Glukosekonzentration noch über 90% des Ausgangswertes. Ein

Medienwechsel während der Inkubationszeit, um gleich bleibende Stimulationsbedingungen zu erhalten, ist daher nicht nötig.

Glukosekonzentrationen im Kulturmedium

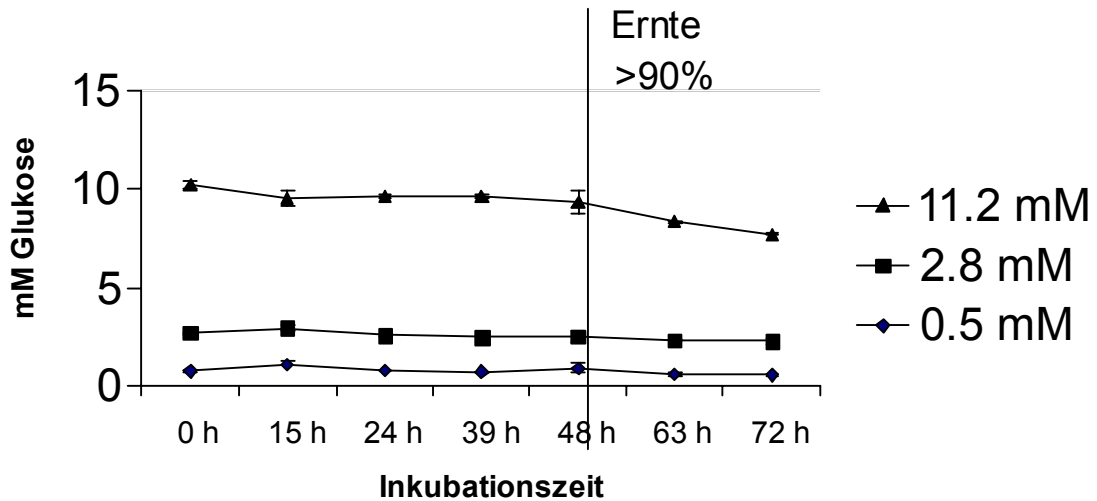


Abbildung 16: Verlauf der Glukosekonzentration im INS-1 Kulturmedium über 72 Stunden bei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen. Über die Dauer der Versuche bleibt die Glukosekonzentration weitgehend konstant und liegt nach 48 Stunden noch bei über 90 % des Ausgangswertes.

4.1.5. Glukotoxizität

Bei deutlich über den physiologischen Bereich erhöhten Glukosespiegeln kommt es zu einer verminderten Insulingenexpression und einem Abfall des IDX-1 Proteingehaltes in Betazellen des endokrinen Pankreas. Dieser Effekt ist unter dem Namen Glukotoxizität bekannt.

Wir konnten einen Abfall an IDX-1 Protein in INS-1 Zellen bei Glukosekonzentrationen über 11.2 mM nach 48 Stunden beobachten. Dieser Abfall in der Proteinkonzentration von IDX-1 resultiert nicht aus einer verminderten transkriptionellen Aktivität; die Promotoraktivität bleibt auch bei erhöhten Glukosekonzentrationen weitgehend konstant (**Abbildung 17**, **Abbildung 18**).

Glukotoxizität

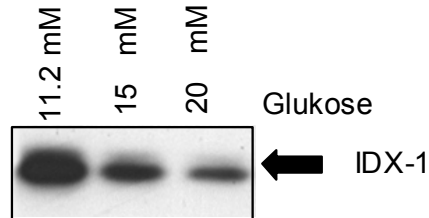


Abbildung 17: Hyperglykämie bewirkt in INS-1 Zellen einen Abfall von IDX-1 Protein. Die Zellen wurden für 48 Stunden in Medien mit den angegebenen Glukosekonzentrationen kultiviert.

Glukotoxizität

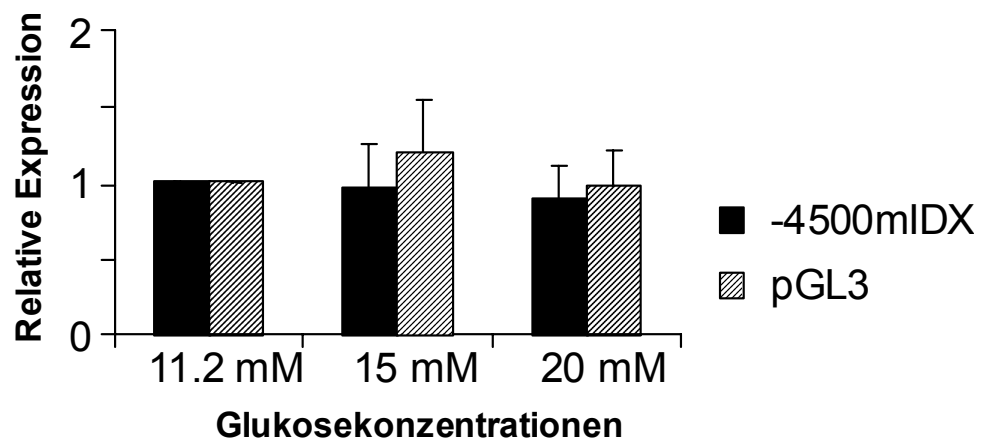


Abbildung 18: Glukotoxischer Verlust von IDX-1 in INS-1 Zellen ist nicht auf verringerte Promotoraktivität zurückzuführen. Gezeigt ist ein Mittel aus zwei Experimenten im Duplikat, normalisiert auf die Aktivität bei 11.2 mM Glukose. Das Experiment wurde analog zu den in **Abbildung 15** gezeigten Experimenten durchgeführt.

4.1.6. Der IDX-1 Promotor

Der IDX-1 Promotor der Maus, an dem die zuvor gezeigten Experimente durchgeführt wurden, besteht aus 4,6kb. Um die für die Promotoraktivierung entscheidenden Bereiche näher zu lokalisieren, führten wir Aktivitäts- und Stimulationsuntersuchungen mit 5'-Deletionskonstrukten des mIDX-1

Promotors durch. Zunächst untersuchten wir die Aktivität der IDX-1 Promotordeletionskonstrukte in INS-1 Betazellen (**Abbildung 19**).

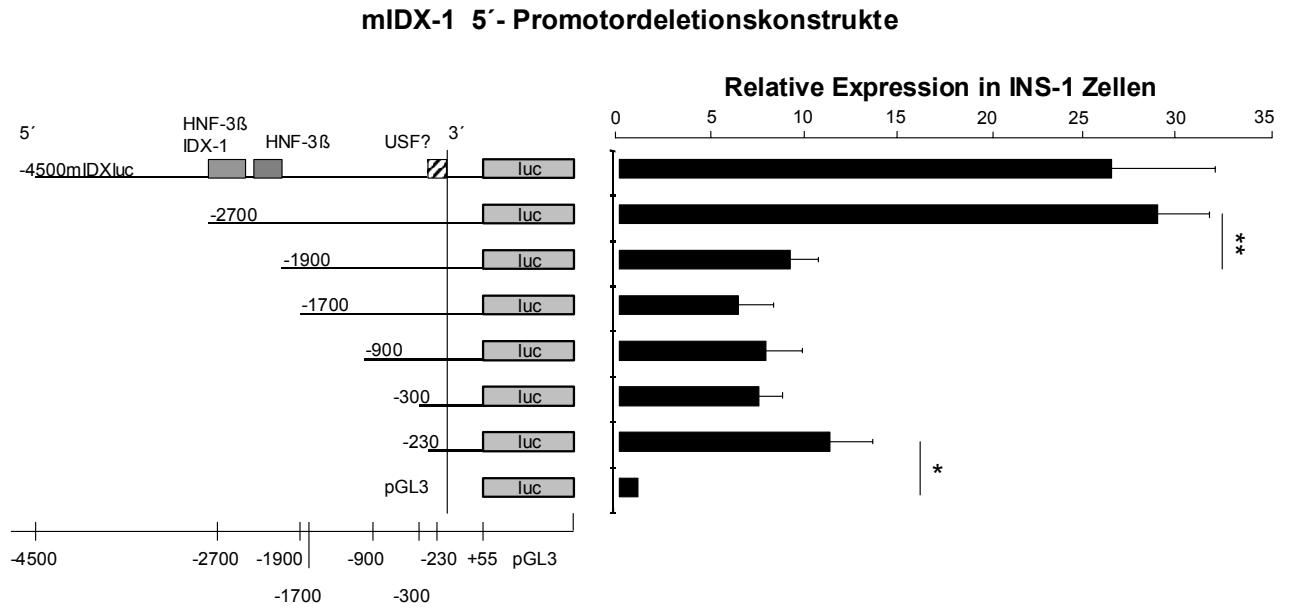


Abbildung 19: Aktivität von mIDX-1 5'-Promotordeletionskonstrukten in INS-1 Betazellen. Es wurde je 0.5 µg Reporterplasmid transfiziert und nach 48 Stunden die Luciferaseaktivität bestimmt. Gezeigte Ergebnisse sind ein Mittel aus vier Experimenten als Duplikat, relativ zur Aktivität des Leervektors. ** p<0,01 *p<0,05

Der -4500mIDX-1 Promotor zeigt im Reportervektor pGL3 in INS-1 Zellen eine ungefähr 30-fach stärkere Luciferaseaktivität als der Leervektor pGL3 allein. Nach 5'-Deletion des mIDX-1 Promotors auf ein 1900 bp langes Fragment beobachteten wir einen Abfall der Promotoraktivität um 66%, verglichen mit der -2700 mIDX-1 Promotoraktivität. Dieser Abfall der Promotoraktivität impliziert, dass in diesem Bereich wichtige Transkriptionsfaktoren binden. In der Literatur wurden bereits zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HNF-3β beschrieben, die eine gewebsspezifische Expression von IDX-1 in der Betazelle vermitteln. In unseren Promotordeletionskonstrukten befinden sich diese beiden HNF-3β Bindungsstellen zwischen 2700mIDXluc und 1900mIDXluc und können den starken Aktivitätsabfall erklären (siehe **Abbildung 19**). Im Bereich von -1900 bp bis zu -230 bp des Promotors kommt es nach Deletion zu keinem signifikantem Aktivitätsabfall, sodass dieses Experiment keinen Hinweis auf

transkriptionsaktive Bereiche in diesem Abschnitt gibt. Die proximalen 230 bp des mIDX-1 Promotors weisen im Vergleich zum Leervektor (pGL3) noch immer eine 10-fach stärkere Aktivität auf, was bedeutet, dass sich in diesem Bereich noch für die Aktivität wichtige Bindungsstellen befinden.

4.1.7. Mapping

Die vorangegangene Charakterisierung des mIDX-1 Promotors zeigte, dass entscheidende Promotorelemente im Bereich zwischen –2700 bp und –1900 bp und in den proximalen 230 bp liegen.

Vorangegangene Experimente zeigten, dass der IDX-1 Promotor durch Glukose stimuliert werden kann. Im Folgenden wurde nun versucht, die Elemente im Promotor zu lokalisieren, die für diese glukoseabhängige Aktivierbarkeit verantwortlich sind. Dazu führten wir Stimulationsversuche mit den 5'-Deletionskonstrukten des mIDX-1 Promotors durch. Für die Stimulation wurden die Glukosekonzentrationen mit dem größtem Effekt am mIDX-1 Promotor (4500 bp) gewählt. Die Deletionskonstrukte wurden in INS-1 Betazellen transfiziert und über 48 Stunden in Medien mit 0.5 mM und 11.2 mM Glukose inkubiert.

In Grafik A der **Abbildung 20** ist die Aktivität der einzelnen Promotorkonstrukte bei 0.5 mM und 11.2 mM Glukosekonzentration dargestellt. Es kommt bei –1900 bp und ab 230pb zu dem oben bereits charakterisierten Aktivitätsabfall des Promotors. In Grafik B wurde nun das Verhältnis der Aktivität zwischen 0.5 mM Glukose und 11.2 mM Glukose prozentual dargestellt. Glukose führt also im vollständigen –4500 bp mIDX-1 Promotor zu einer 284% Aktivierung. Diese Aktivierung steigt bei 5' Deletion des Promotors stetig bis auf einen Wert von 400% an. Dieser Anstieg könnte durch den Wegfall von repressiven Transkriptionsfaktoren zustande kommen. Es besteht allerdings kein dafür typischer sprunghafter Anstieg. Zwischen –900 bp und –230 bp kommt es zu einem ersten signifikanten Abfall der Promotoraktivierung durch Glukose. Interessanterweise ist die relative Aktivierung im -230 bp Element mit 268% fast genau so groß wie die Aktivierung im ursprünglichen –4500 bp mIDX-1 Promotor mit 284%. Dies deutet darauf hin, dass in den proximalen –230 bp

des mIDX-1 Promotors noch wichtige glukoseresponsive Elemente lokalisiert sind. Der Bereich zwischen -900 bp und -300 bp zeigt kaum Homologien zum IDX-1 Promotor anderer Spezies. Bei der internetbasierten TFSEARCH-Analyse, ergaben sich wenig wahrscheinliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen in diesem Bereich (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Daher untersuchten wir zunächst die proximalen 230 bp des Promotors.

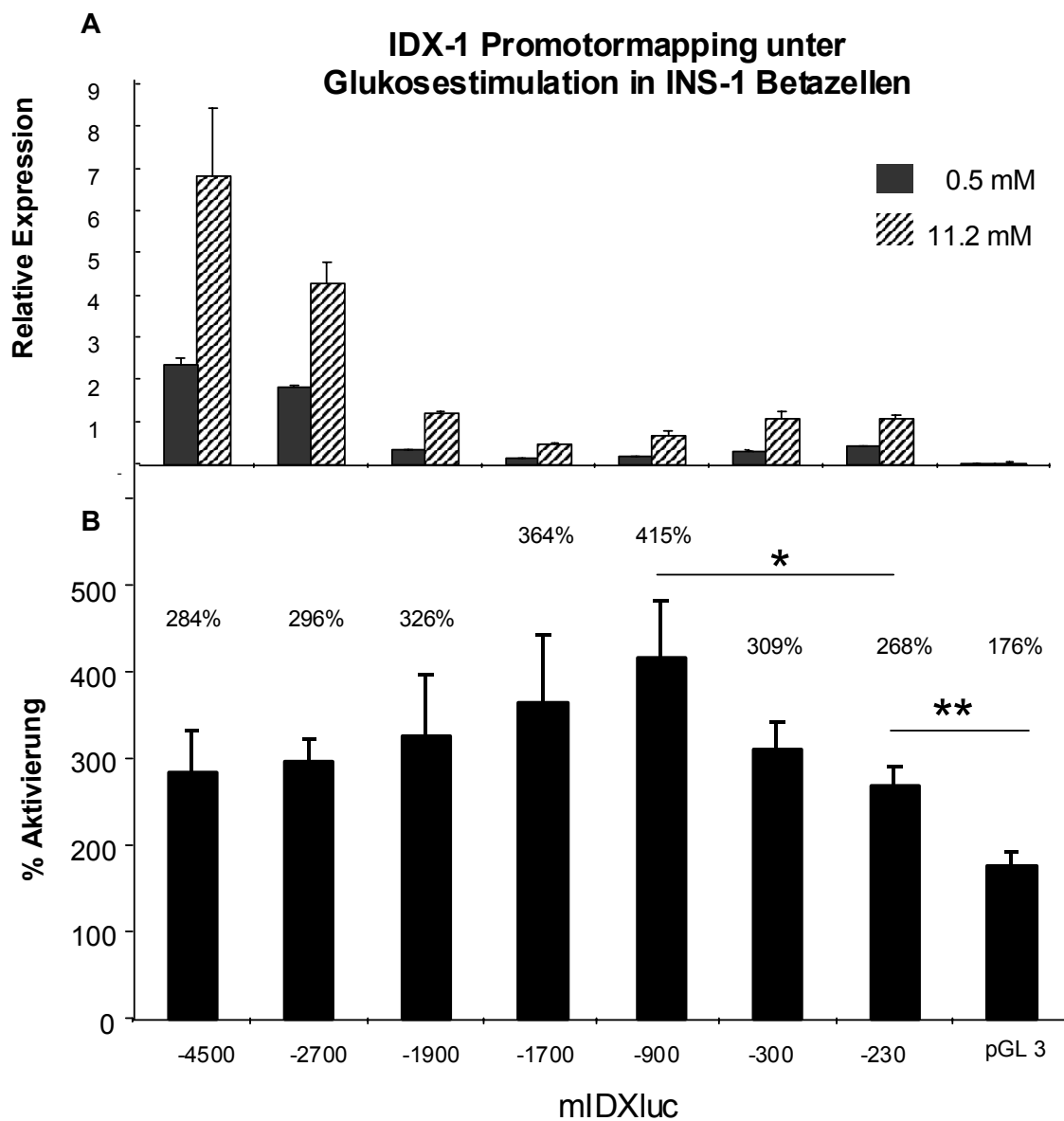


Abbildung 20: Glukoseabhängige mIDX Promotoraktivität in INS-1 Betazellen. Grafik A zeigt die tatsächliche Aktivität der 5' Deletionskonstrukte bei 0.5 mM und 11.2 mM Glukose. In Grafik B ist die glukoseabhängige Aktivierung der 5' Deletionskonstrukte des mIDX-1 Promotors prozentual aufgetragen. Daten aus vier Experimenten im Duplikat wurden gemittelt. Man erkennt zwei signifikante Aktivierungsabfälle bei -900 bp-230 bp um 35% und bei 230 bp-0 bp um weitere 35%.

4.1.8. Wechsel des Basisvektors

Die Aktivierung des -230mIDX Promotors durch Glukose konnte auch in anderen Vektorsystemen beobachtet werden. SKluc ist ein Basisvektor für Luziferasereporterassays, der häufig eine geringere Anfälligkeit gegenüber Leervektoraktivierungen zeigt als pGL3. In SKluc findet man eine geringfügig stärkere Aktivierung des -230mIDX-1 Fragments durch Glukose als in pGL3 bei etwa gleich großer Leervektoraktivierung. Absolut ist die Aktivität des -230mIDX-1 Promotorfragments in SKluc deutlich geringer als in pGL3.

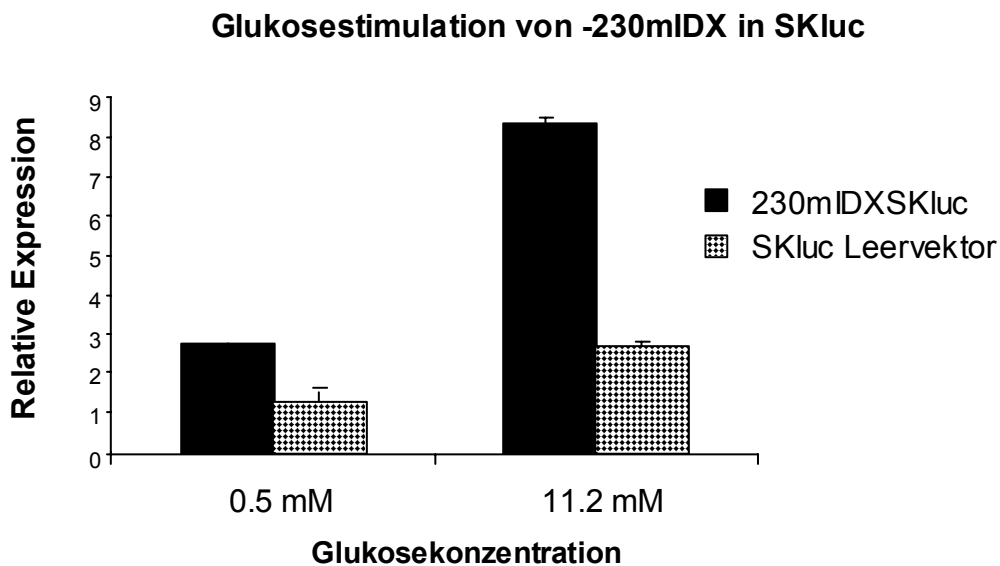


Abbildung 21: Glukosestimulation von -230mIDXSKluc in INS-1 Betazellen.

4.2. Identifizierung glukoseresponsiver DNA-Elemente im IDX-1 Promotor

4.2.1. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Es wurden sechs überlappende, doppelsträngige Oligonukleotide (N1-N6) von ungefähr 60 bp Länge konstruiert, welche die -230 Region des mIDX-1 Promotors abdecken.

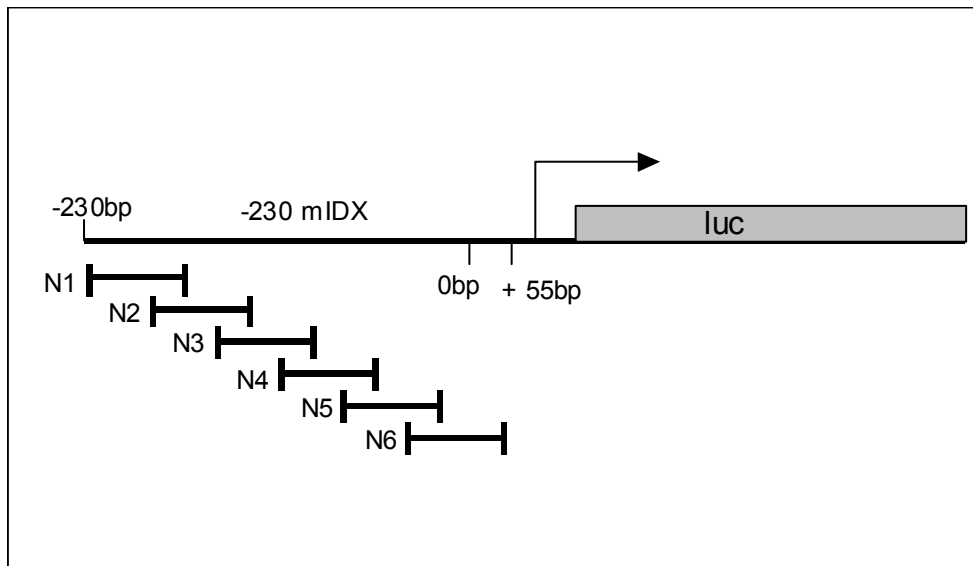


Abbildung 22: Schematische Darstellung der EMSA Oligonukleotide im proximalen IDX-1 Promotor. Der im -230mIDXluc Reporterplasmid enthaltene Anteil des IDX-1 Promotors wird von sechs überlappenden Oligonukleotiden von ~ 60 bp Länge überspannt.

Mit diesen Oligonukleotiden wurden EMSAs mit Kernextrakten aus glukosebehandelten INS-1 Zellen durchgeführt. Am Oligonukleotid N3 (-66 bp -10 bp) beobachteten wir die Bildung eines Komplexes (Shift), der sich glukoseabhängig verstärkt (siehe **Abbildung 27**). Die Intensität anderer Komplexe (z.B. in N2) nahm unter Glukosestimulation nicht zu.

Mit denselben Kernextrakten konnte als Positivkontrolle eine glukoseabhängige Bindungszunahme an glukoseresponsiven Elementen von FarFlat (**Abbildung 2**) des Insulinpromotors beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Das Oligonukleotid N3 enthält eine E-Box (-49 bp -44 bp). Eine E-Box ist ein Sequenzelement, an das viele Transkriptionsfaktoren binden können.

Um zu bestätigen, dass der glukoseabhängige Komplex in N3 durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese E-Box entsteht, führten wir Versuche mit Kompetitoren durch. Ein 20 bp langes, nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid (**E**), das diese E-Box enthält, konkurriert mit Oligonukleotid N3 um Bindung der Transkriptionsfaktoren (**Abbildung 23**). Die Zugabe von E in zehnfachem Überschuss führte zu einer verminderten Bildung des glukoseabhängigen Komplexes mit N3; 100-facher Überschuss führte zur vollständigen Aufhebung dieses Komplexes (**Abbildung 24**). Eine E-Box ist durch die Sequenz CANNTG definiert. Die beiden mittleren Basen spielen hierbei keine Rolle. Das Oligonukleotid **EM1** enthält eine Mutation dieser E-Box. Im Oligonukleotid **EM2** ist die E-Box erhalten und nur die mittleren beiden Basen sind mutiert. Diese mittleren Basen (CG) sind spezifisch für die Bindung von USF-Transkriptionsfaktoren. Die beiden mutierten E-Box Oligonukleotide (EM1 und EM2) sind im Gegensatz zu E, nicht in der Lage die Bildung des glukoseabhängigen Komplexes zu antagonisieren (**Abbildung 25**).

4.2.2. Gelshiftoleoligonukleotide und Mutationen:

N3: 5'-ATGGC TCCAG GGTAA ACCAC GTGGG GTGCC CCAGA GCCTA TGGCA
CGGCG GCCGG CT-3'

E	5'-CAG GGTAA ACCAC <u>GTGGG</u> GT-3'	E-Box
EM1	5'-CAG GGTAA ACAAC <u>GCGGG</u> GT-3'	E-Boxmutante 1
EM2	5'-CAG GGTAA ACCAA <u>TTGGG</u> GT-3'	E-Boxmutante 2

Abbildung 23: Sequenz des Oligonukleotids N3 und E, sowie der mutierten Oligonukleotide EM1 und EM2. N3 entspricht dem Bereich -66 bp - -10 bp des Maus IDX-1 Promotors. E, EM1 und EM2 wurden als Kompetitoren verwendet. Die E-Boxsequenz, sowie die mutierten Basen sind hervorgehoben.

EMSA mit Kompetitoren

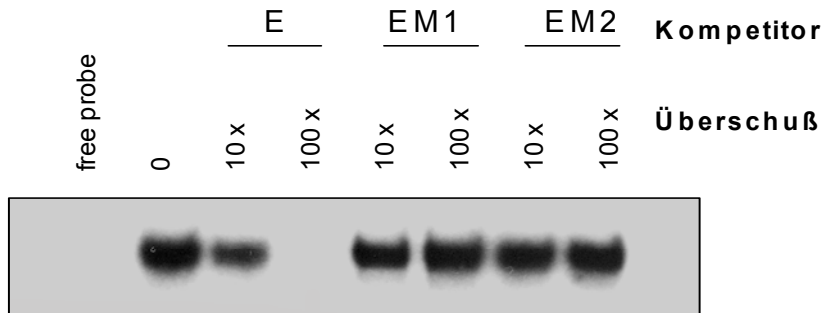


Abbildung 24: EMSA mit nichtradioaktiven Kompetitoren. Zugabe von 100-fachem Überschuss eines kurzen Oligonukleotids E aus N3 hebt den glukoseabhängigen Komplex vollständig auf. Die mutierten Oligonukleotide EM1 und EM2 beeinträchtigen den Komplex nicht. Es handelt sich um eine sequenzspezifische Bindung an das E-Boxmotiv in N3.

EMSA mit E-Boxmutanten

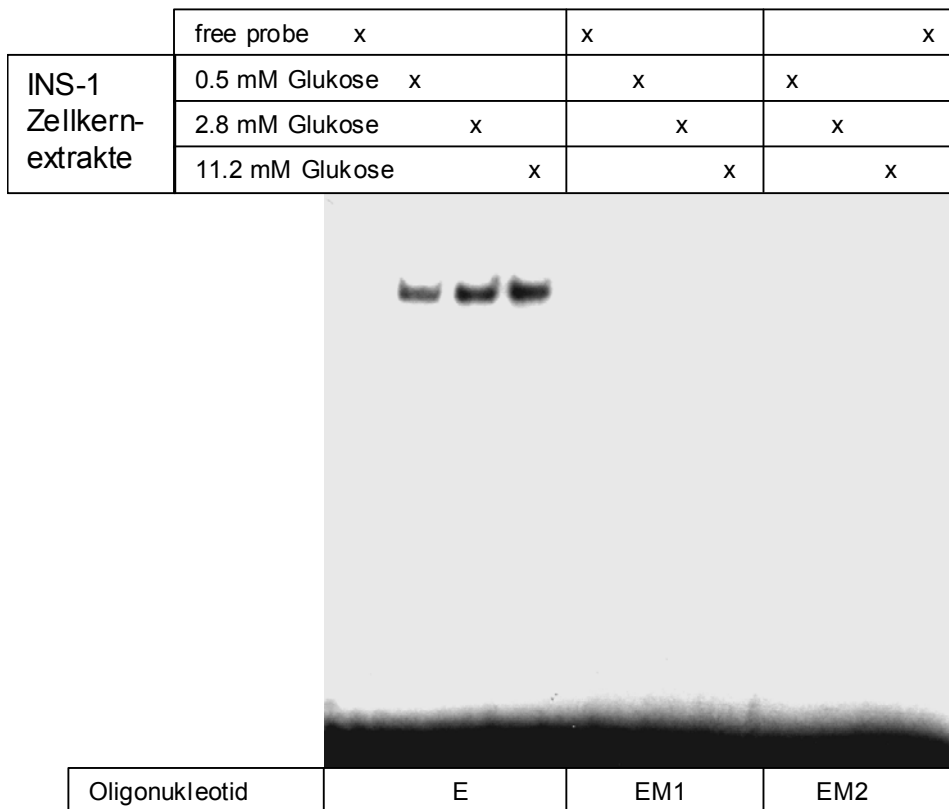


Abbildung 25: EMSA mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden E, EM1 und EM2. Auch das kurze Oligonukleotid E ist in der Lage einen glukoseabhängigen Komplex zu bilden. Die mutierten Oligonukleotide EM1 und EM2 sind beide nicht zur Bildung von Komplexen in der Lage.

Bei der Durchführung eines EMSAs mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden E, EM1 und EM2 zeigten weder EM1 noch EM2 die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes, während E weiterhin einen glukoseverstärkten Komplex bildete. Diese Ergebnisse zeigen, dass die glukoseabhängige Bindung von Transkriptionsfaktoren am proximalen -230 bp Fragment des mLDX-1 Promotors spezifisch an einem E-Boxelement (-49 bp -44 bp) erfolgt. Die Bindung ist dabei nicht nur abhängig von der E-Boxsequenz, sondern benötigt das vollständige Sequenzmotiv CACGTG. Dies spricht für eine Beteiligung von USF Transkriptionsfaktoren an der Komplexbildung.

4.2.3. TF Search

Eine internetbasierte Suche nach Transkriptionsfaktoren, die an N3 binden können, TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), zeigt eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Sequenz der E-Box binden können.

USF (Upstream Stimulatory Factor): USF-1 (43 kD) und USF-2 (44 kD) sind ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen eine Helix-loop-helix Domäne und sind mit c-myc verwandt.

n-myc/c-myc: n-myc/c-myc sind Transkriptionsfaktoren, die bei der Zellproliferation, Differenzierung und Karzinogenese eine Rolle spielen. c-myc wird verstärkt in Lungen-, Mamma- und Kolonkarzinomen exprimiert, während n-myc vermehrt in Neuroblastomen exprimiert wird.

SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein): SREBP steht in Verbindung mit dem Cholesterinstoffwechsel. In cholesterinabhängigen Zellen reguliert SREBP die Expression des LDL-Rezeptorgens abhängig vom Cholesterinbedarf der Zelle. Es trägt auch den Namen ADD1 (Adipocyte Determination and Differentiation Factor).

Ergebnisse

TFSEARCH Search Result
** TFSEARCH ver.1.3 ** (c)1995 Yutaka Akiyama (Kyoto Univ.)
TFMATRIX entries with High-scoring:

1 ATGGCTC CAG GGTAAACCAC GTGGGGTGCC CCAGAGCCTA TGGCACGGCG	entry	score
----->	M00217 USF	95.6
<-----	M00217 USF	95.6
<-----	M00055 N-Myc	91.5
----->	M00122 USF	91.0
<-----	M00122 USF	91.0
----->	M00121 USF	89.8
<-----	M00121 USF	89.8
----->	M00119 Max	89.4
<-----	M00119 Max	89.4
----->	M00055 N-Myc	88.7
----->	M00271 AML-1a	87.4
----->	M00123 c-Myc/	86.8
----->	M00118 c-Myc/	86.0
<-----	M00118 c-Myc/	86.0
<-----	M00221 SREBP	85.9

51 GCCGGCT

This simple routine searches highly correlated sequence fragments versus TFMATRIX transcription factor binding site profile database by E.Wingender, R.Knueppel, P.Dietze, H.Karas (GBF-Braunschweig).

Abbildung 26: Ergebnis der TFSEARCH für das N3 Oligonukleotid. TFSEARCH ist ein internetbasiertes Programm, das mögliche Bindungsstellen sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren anzeigt (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) (109).

4.2.4. Supershift

Mithilfe von spezifischen Antiseren gegen Transkriptionsfaktoren kann man, in so genannten Supershiftexperimenten, Proteine identifizieren, die an die E-Box binden. Die Supershiftexperimente zeigten, dass sowohl USF-1, als auch USF-2 an das E-Boxmotiv im Oligonukleotid N3 binden. Weder für c-myc, n-myc, noch SREBP konnte eine Bindung an das Oligonukleotid N3 nachgewiesen werden.

USF-1 und USF-2 binden als Homo- und Heterodimere an das E-Boxmotiv im Oligonukleotid N3; es verbleibt jeweils eine Bande, die den homodimeren

Transkriptionsfaktor enthält. Man erkennt deutlich den Größenunterschied der beiden Transkriptionsfaktoren (**Abbildung 27**). USF-1 und USF-2 sind beide bei hohen, wie auch bei niedrigen Glukosekonzentrationen im Komplex vorhanden und gemeinsam an seiner glukoseabhängigen Verstärkung beteiligt. In diesem Experiment ist USF-1 bei niedriger Glukosekonzentration weniger stark beteiligt als bei hoher Glukosekonzentration (**Abbildung 28**).

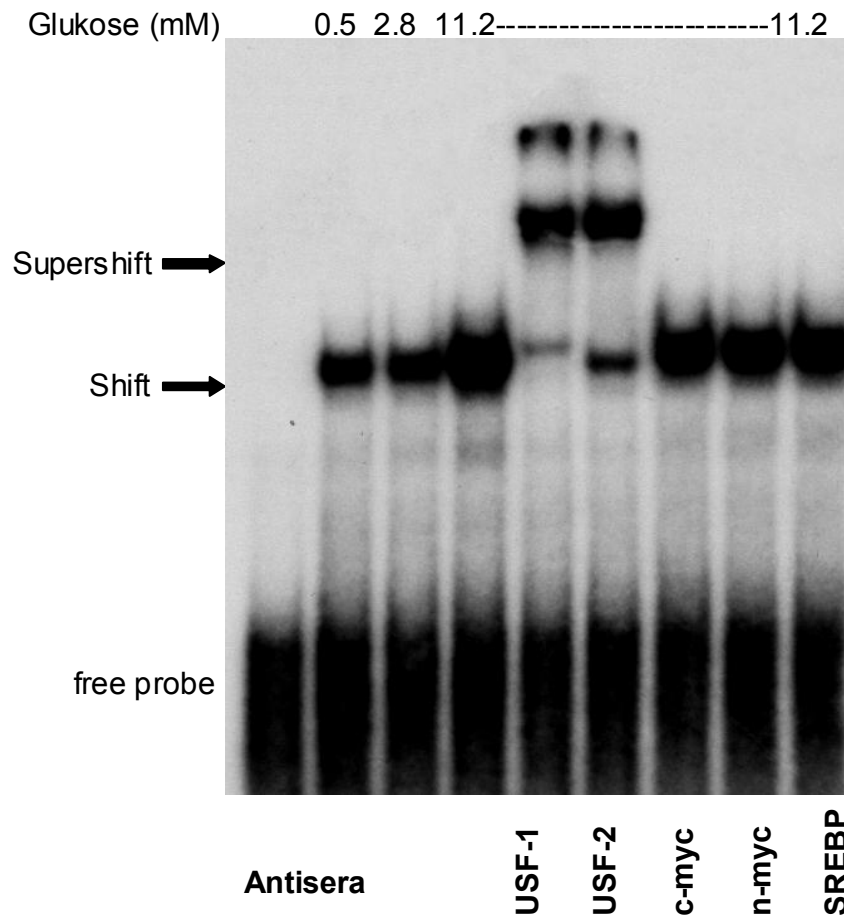


Abbildung 27: EMSA und Supershiftexperiment des Oligonukleotids N3. Präinkubation mit Antisera gegen USF-1 und USF-2 führt zur Bildung eines größeren Protein-Antikörperkomplexes (Supershift), da diese beiden Proteine am N3 Oligonukleotid binden. Antisera gegen c-myc, n-myc und SREBP bilden keinen Komplex.

Ergebnisse

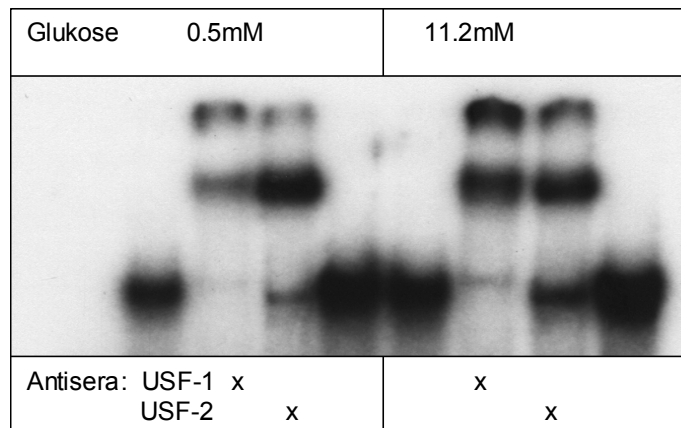


Abbildung 28: Supershiftexperiment von USF-1 und USF-2 an N3. Vergleich von Kernextrakten aus INS-1 Zellen, die bei niedriger und hoher Glukosekonzentration inkubiert wurden. Beide Faktoren sind bei hoher wie bei niedriger Glukosekonzentration am Komplex beteiligt. In diesem Experiment ist USF-1 bei niedriger Glukosekonzentration weniger stark beteiligt, als bei hoher.

4.2.5. Mutational Cloning des IDX-1 Promotors

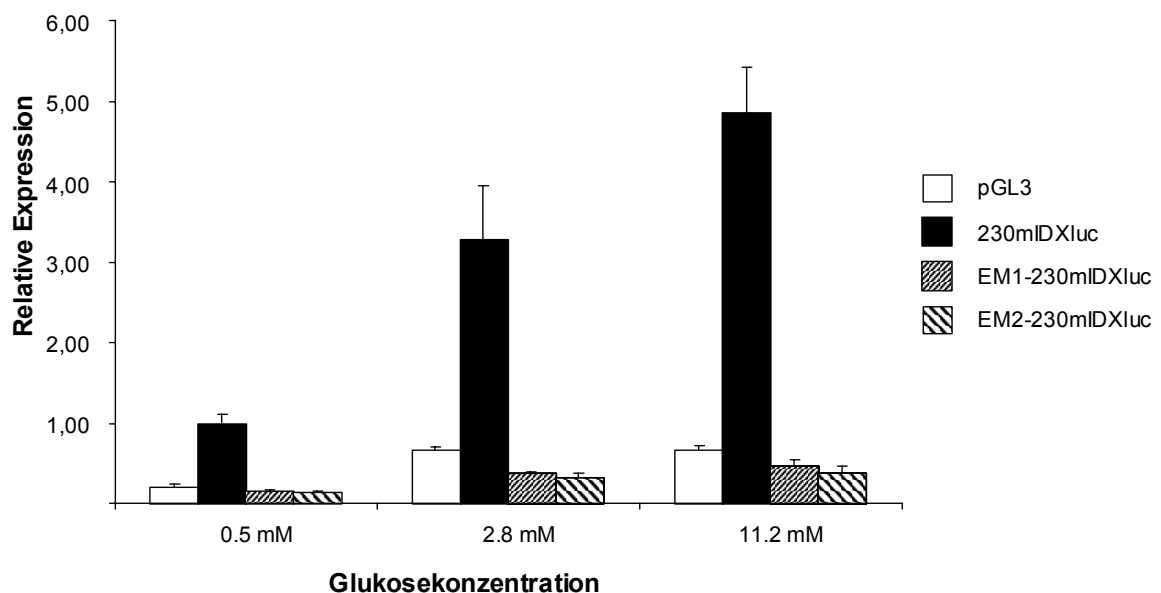


Abbildung 29: Aktivität des -230mIDX Promotors mit intaktem und mutiertem E-Boxmotiv EM1 und EM2 unter Glukosestimulation. Die E-Boxmutationen reduzieren die Aktivität des -230 mIDX Promotors fast vollständig. Die Stimulierbarkeit durch Glukose wird dadurch auf 61% (EM1) bzw. 57% (EM2) reduziert.

Um zu zeigen, dass das E-Boxmotiv wirklich ein glukoseresponsives Element (GRE) ist und die Bindung von USF eine funktionelle Bedeutung für die Glukoseresponse des mIDX-1 Promotors besitzt, mutierten wir im Reporterkonstrukt -230mIDXluc die E-Box entsprechend den Oligonukleotiden EM1 und EM2. In transienten Transfektionen von INS-1 Zellen konnten wir zeigen, dass eine Mutation des proximalen E-Boxmotives die Promotoraktivität auf ein Niveau unterhalb der Leervektoraktivität verringert. Auch die glukoseabhängige Stimulierbarkeit im -230mIDXluc Konstrukt wurde dadurch auf 61% (EM1) bzw. 57% (EM2) reduziert.

Dies deutet darauf hin, dass die identifizierte E-Box zwar ein GRE ist, der -230 Maus IDX-1 Promotor jedoch noch weitere glukoseresponsive Elemente enthält.

4.3. Regulation des IDX-1 Promotors in Betazellen des endokrinen Pankreas durch GLP-1

Bei der Untersuchung der Regulation des IDX-1 Promotors durch GLP-1 konnte in transienten Transfektionen von INS-1 Betazellen eine Aktivierung des Reporterplasmids -4.5mIDXluc durch GLP-1 gezeigt werden. Zunächst versuchten wir, durch Optimierung der Inkubationszeit (3-48 Stunden) und der GLP-1 Konzentration einen möglichst großen aktivierenden Effekt zu erreichen. Außerdem wurde die Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen durchgeführt, um zu untersuchen, ob der transkriptionelle Effekt von GLP-1 auf die IDX-1 Expression glukoseabhängig ist. Dies ist von Interesse, da eine glukoseabhängige Insulinsekretion durch GLP-1 bereits gezeigt wurde⁽⁸⁵⁾. Quantitativ zeigten sich die erzielten Effekte wenig konstant. Unterschiede in der Wirksamkeit von GLP-1 (10 nM) und seinem Analogon Exendin-4 (1 nM) konnten nicht festgestellt werden. Die Wirksamkeit der Stimulation wurde in Stichproben durch die Aktivierung des Insulinpromotors im -410 rINS1-LUC Plasmid bestätigt. **Abbildung 30** zeigt ein Mittel aus drei Versuchen mit 48-stündiger Stimulation mit 10 nM GLP-1. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine maximale Aktivierung des IDX-1 Promotors.

GLP-1 Regulation des Maus IDX-1 Promotors (4500mIDXluc) in INS-1 Betazellen

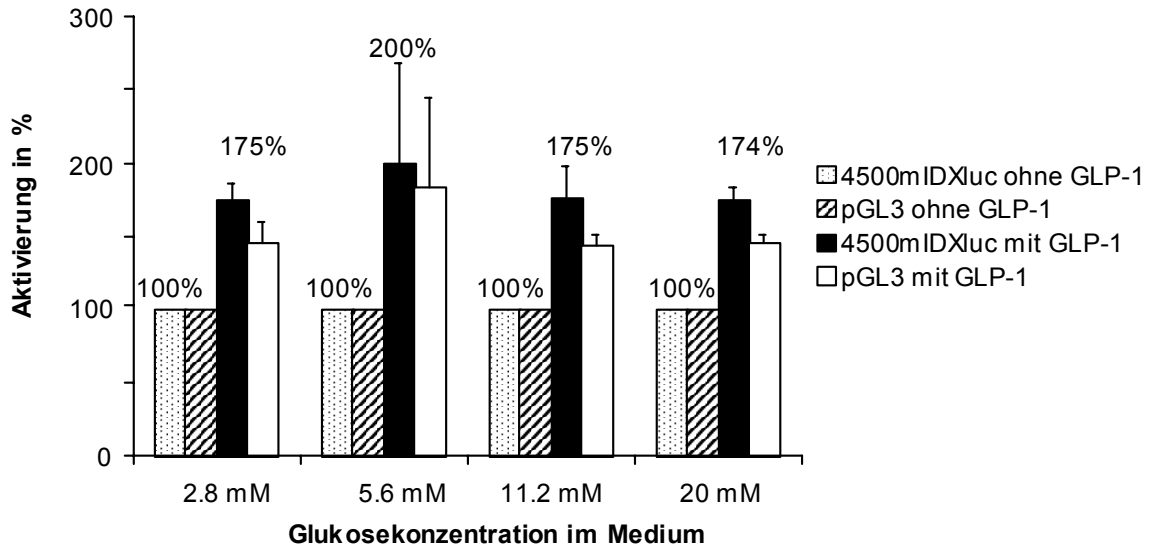


Abbildung 30: Aktivierung des -4500mIDXluc Reporters und des Leervektors durch Stimulation mit GLP-1 (10 nM) über 24 Stunden bei steigenden Glukosekonzentrationen. Gezeigt ist die prozentuale Aktivität des Reporters bzw. Leervektors nach GLP-1 Stimulation; die Aktivität des Reporters bzw. Leervektors ohne GLP-1 bei den angegebenen Glukosekonzentrationen wurden als 100% festgelegt. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Die Versuche wurden mit INS-1 Zellen der Passagen p107 und p114/115 durchgeführt.

GLP-1 bewirkt eine signifikante Aktivierung des Reporterplasmids um ungefähr 80%. Jedoch wird auch der Leervektor stark mitaktiviert, teilweise kommt es sogar zu einer signifikanten Aktivierung. Die Aktivierung des Promotors liegt ~20% über der Aktivierung des Leervektors und unterscheidet sich von dieser (mit $t = 0.1-0.33$) nicht signifikant. Im Western Blot konnte auch bei Experimenten, bei denen eine starke Promotoraktivierung zu beobachten war, kein eindeutiger Einfluss von GLP-1 auf den IDX-1 Proteingehalt in INS-1 Zellen gefunden werden. Bei der Aktivierung des Reporterplasmids ist somit eine unspezifische Aktivierung des Leervektors nicht auszuschließen.

4.4. Autoregulation des IDX-1 Promotors in Betazellen des endokrinen Pankreas

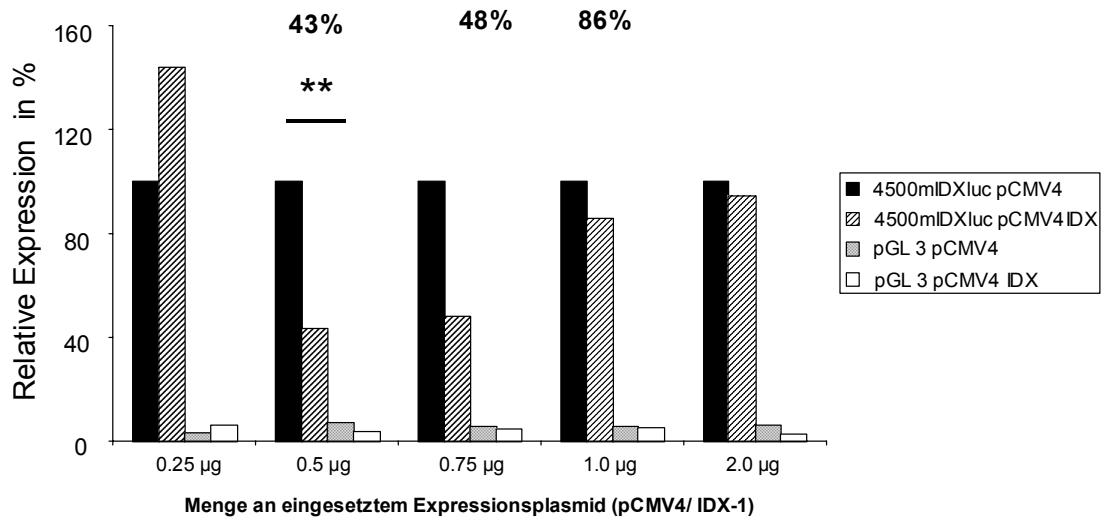


Abbildung 31: Überexpression von IDX-1 vermindert die Aktivität des -4500mIDXluc Reportergens in MIN6 Zellen. Bei Einsatz von 0.5 µg Expressionsplasmid ergibt sich im Mittel aus drei Experimenten eine signifikante Reduktion der Aktivität auf 43 % (+/- 7% SEM) ($t=0.01^{**}$). Die Aktivität des Leervektors ändert sich nicht signifikant auf 112% (SEM 59%) ($t=0.85$)

Um eine mögliche Autoregulation des IDX-1 Promotors zu untersuchen, überexprimierten wir IDX-1 in MIN6 Betazellen. Die Überexpression beeinflusst die IDX-1 Promotoraktivität. Mit 0.5 µg Expressionsplasmid pCMV4 IDX wird die Promotoraktivität, verglichen mit dem leeren Expressionsplasmid, auf 43 % supprimiert. Mit zunehmender Menge an eingesetztem Expressionsplasmid nimmt die Suppression der IDX-1 Promotoraktivität ab.

5. Diskussion

5.1. Glukose als Regulator der IDX-1 Expression

In dieser Arbeit konnte eine Regulation der IDX-1 Expression in Betazellen durch Glukose gezeigt werden. Glukose führt, durch milde Hyperglykämie, zu einer Aktivierung des IDX-1 Promotors. Die zunehmende Promotoraktivität führt zu einer verstärkten Expression von IDX-1 Protein. Verstärkte Aktivität von IDX-1 bewirkt in Betazellen eine Aktivierung des Insulingenpromotors und der Insulinbiosynthese. IDX-1 ist mit Betazellmassenzunahme, Differenzierung und Neogenese assoziiert. Physiologisch ist eine Regulation von IDX-1 durch Glukose sinnvoll, da Hyperglykämie ein Zeichen für erhöhten Bedarf des Organismus an insulinproduzierenden Betazellen darstellt. In vivo, wie in vitro ist milde Hyperglykämie ein starker Stimulus für Betazellwachstum und Differenzierung. Lang anhaltende und schwere Hyperglykämie haben eine toxische Wirkung auf die Betazellfunktion, die auch als Glukotoxizität bezeichnet wird. Hyperglykämie induziert die Expression von spezifischen inhibitorischen Transkriptionsfaktoren wie C/EBP β und vermindert damit die Insulingenexpression. Die Aktivität des Insulinpromotors nimmt unter Bedingungen der Glukotoxizität schnell, aber reversibel ab (7,68,70).

Auch IDX-1 ist an dieser glukotoxischen Einschränkung der Insulingenexpression beteiligt. Schwere Hyperglykämie führt zu verminderter Bindung von IDX-1 am Insulinpromotor und damit zu einer verringerten Aktivierung. Neben diesem Funktionsverlust beobachtet man auch einen Verlust an IDX-1 Protein und mRNA (7,68,70). Durch hohe Glukosespiegel wird die IDX-1 Expression somit auch negativ reguliert. Bei den, in dieser Arbeit gezeigten Versuchen zur Glukosetoxizität ist der glukotoxische Verlust der IDX-1 Expression nicht auf eine Abnahme der IDX-1 Promotoraktivität zurückzuführen. Die IDX-1 Promotoraktivität bleibt unter glukosetoxischen Kulturbedingungen konstant. Diese Daten bestätigen Beobachtungen von Olson *et al.* am STF-1 Promotor der Ratte (110). Olson *et al.* zeigten, dass der

Verlust an IDX-1 mRNA auf eine posttranskriptionelle Beeinflussung der mRNA Stabilität zurückzuführen ist. Bei der glukoseabhängigen Steigerung der IDX-1 Expression und der glukotoxischen Verringerung der IDX-1 Expression handelt es sich also um unabhängige, gegenläufige Effekte auf Ebene der Transkription und auf Ebene der mRNA Stabilität.

Wir konnten innerhalb des -4500mIDX-1 Promotors zwei Regionen identifizieren, die für die glukoseabhängige Stimulation des Maus IDX-1 Promotors verantwortlich sind. In der proximalen Region des IDX-1 Promotors, welche 230 bp 5' des Maus IDX-1 Gens umfasst, fanden wir glukoseabhängige Bindung der Transkriptionsfaktoren USF-1 und USF-2 an ein E-Boxmotiv (-49 bp - -44 bp). Die Mutation des E-Boxsequenzmotivs hebt die Bindung von USF auf. Auch die glukoseabhängige Promotoraktivierung in Luziferasereportergenassays wird durch Mutation des E-Boxmotivs vermindert. Das E-Boxmotiv ist also funktionell ein glukoseresponsives Element (GRE); es ist über Spezies hinweg im IDX-1 Promotor von Maus, Ratte und Mensch konserviert.

USF sind nährstoffsensitive Faktoren, die glukoseabhängige Genexpression in Leber und Pankreas regulieren. USF-1 (43 kD) und USF-2 (44 kD), die von getrennten Genen kodiert werden, sind ubiquitär exprimierte Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen eine basische Helix-loop-helix Domäne und sind mit c-myc verwandt. Nährstoffabhängige Genregulation durch USF wurde bereits für das L-Pyruvatkinasegen (111,112), das *free fatty acid* Synthasegen in der Leber (113) und das lipolyseassoziierte S14 Gen gezeigt (114-115). Es gibt Hinweise, dass USF an der Regulation des GRE (glukoseresponsives Element) des Glucagon Rezeptor Promotors der Ratte beteiligt ist (116).

USF können sowohl als Homo- als auch als Heterodimere an DNA binden. Meist liegt die heterodimere Form vor. In den gezeigten Supershiftexperimenten mit USF-1 oder USF-2 Antiseren bleibt jeweils ein geringer Teil der Bande unverändert (**Abbildung 27**). Man erkennt bei dieser verbleibenden Bande einen deutlichen Größenunterschied bei Verwendung von USF-1 und USF-2 Antiseren. Es handelt sich dabei um Homodimere von USF-1 bzw. USF-2 mit unterschiedlicher Masse, welche im Gegensatz zu den Heterodimeren von den

jeweils anderen Antisera nicht erkannt werden. Es kommt daher hier nur zu einer teilweisen Bandenverschiebung in den Supershiftexperimenten. Das Vorkommen von homodimerem USF ist, verglichen mit heterodimerem USF, dessen Bande im Supershift verschoben wird, sehr gering.

Das anteilige Vorkommen von Homo- und Heterodimeren ist gewebsabhängig. Die Rolle der einzelnen Faktoren wurde in USF-1 und USF-2 Knockoutmäusen untersucht. USF-2 Knockoutmäuse zeigen unter anderem eine eingeschränkte Glukoseresponsivität der USF-regulierten Gene S14 und L-PK, während USF-1 Knockoutmäuse unauffällig sind. USF-2 scheint also die hauptsächliche Transaktivierungsaktivität zu besitzen (117,118). Experimente in Zelllinien ohne USF Aktivität bestätigen diese Daten (119). Neben der nährstoffabhängigen Genregulation wurde auch zellzyklusabhängige Genexpression durch USF für *cdc2* und den Cyclin b1 Promotor beschrieben (113,120). Die Aktion von USF wird durch p300 moduliert (121). Auch im STF Promotor der Ratte wurde eine USF Bindungsstelle beschrieben (98). Qian *et al.* zeigten eine funktionelle Regulation des PDX-1 Gens durch USF-2. Durch Überexpression einer dominant negativen Mutante von USF-2 in INS-1 Zellen nimmt der IDX-1 Gehalt der Zellen ab und die Aktivität des Rattenpromotors sinkt um ~50% (122).

Die dort beschriebene USF Bindungsstelle und die direkte Umgebung zeigt eine hohe Homologie zu der von uns untersuchten E-Box im Maus IDX-1 Promotor und ist auch im humanen IDX-1 Promotor konserviert. Sequenzhomologien in Promotoren deuten darauf hin, dass sie wichtige regulatorische Elemente enthalten, die während der Evolution konserviert wurden.

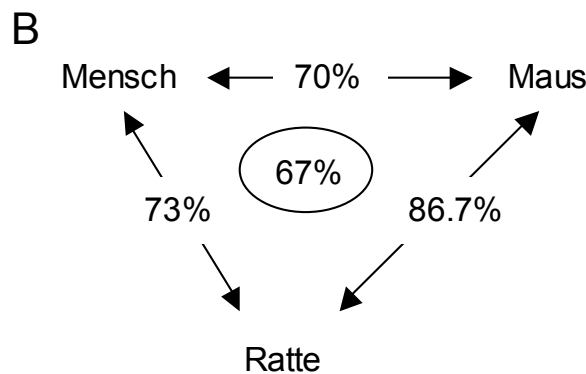
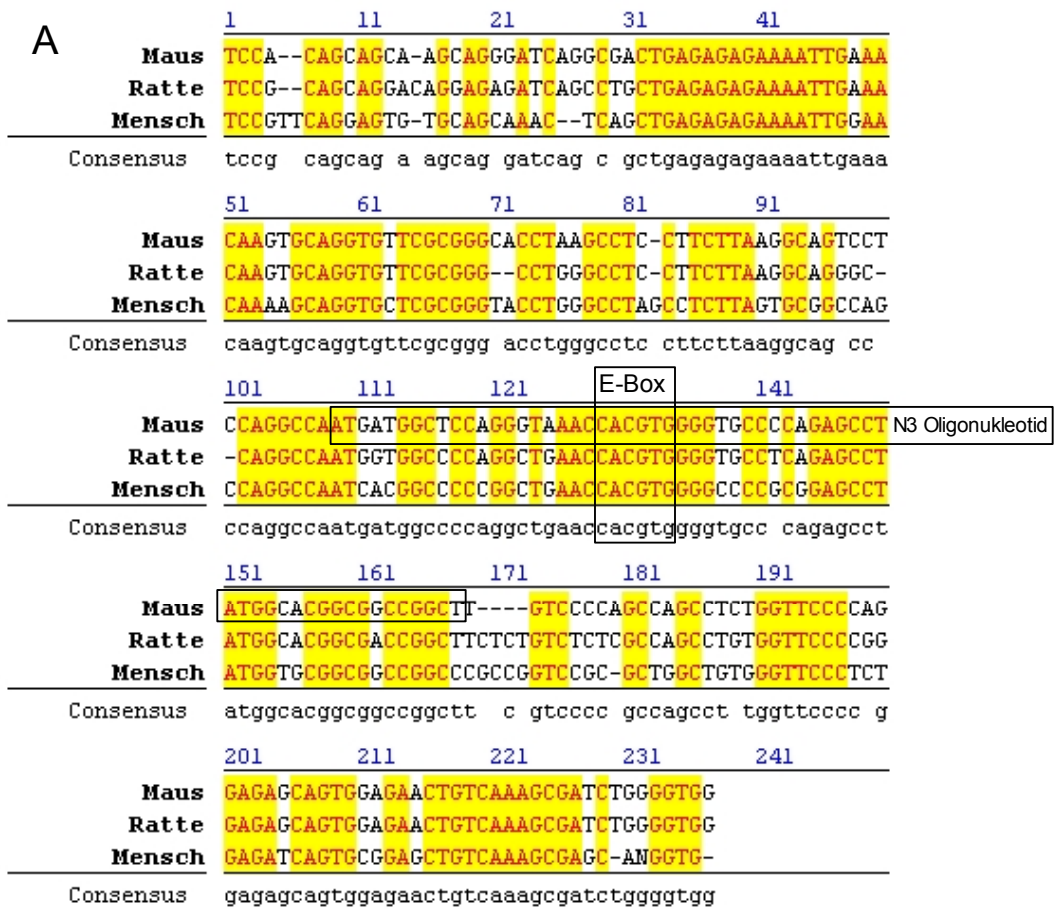


Abbildung 32: A Sequenzhomologien im proximalen IDX-1 Promotor von Maus, Ratte und Mensch. **B** Zeigt den Anteil identischer Basen innerhalb der gezeigten Sequenzen.

Das beschriebene proximale E-Boxelement scheint also maßgeblich an der glukoseabhängigen Aktivierung des IDX-1 Promotors beteiligt zu sein. Da eine Mutation dieses Elements die glukoseabhängige Aktivierung nicht vollständig aufhebt, bleibt zu vermuten, dass der -230 bp Bereich des Maus IDX-1

Promotors noch weitere glukoseabhängige Regulationselemente enthält. Außerdem vermuten wir weitere Regulationselemente, im hier noch nicht näher untersuchten Bereich von -900 bp - -300 bp. Die Ergebnisse zeigen einen möglichen Weg, über den der Stimulus Glukose Betazellwachstum und Differenzierung bewirkt.

5.2. Regulation von IDX-1 durch GLP-1

In dieser Arbeit konnte in klonalen INS-1 Betazellen keine eindeutige Regulation der IDX-1 Expression durch GLP-1 gezeigt werden. Wir konnten durch GLP-1 Stimulation eine annähernd zweifache Aktivierung des IDX-1 Promotors erreichen. Diese liegt jedoch nur ca. 20% über der Leervektoraktivierung und berechtigt so Zweifel an der Spezifität der Aktivierung. Genauere Mappinguntersuchungen waren aufgrund dieser geringen Aktivierung nicht möglich. Man kann eine Promotoraktivierung von ca. 20 % als einen realen Effekt betrachten, wenn Proteingehalt und die Menge an mRNA entsprechend ansteigen. In unseren Versuchen konnten wir, auch in Experimenten mit starker Promotoraktivierung durch GLP-1, bei der Bestimmung des IDX-1 Proteingehaltes im Western Blot keinen eindeutigen Einfluss von GLP-1 auf die Proteinexpression feststellen. Im Gegensatz dazu zeigten die Arbeiten von Wang *et al.* (96) und Buteau *et al.* (97) einen Einfluss von GLP-1 auf die IDX-1 Expression. Bei den beschriebenen Effekten handelte es sich um einen Anstieg der mRNA um maximal 40%, der bereits nach 20 Minuten nur noch 20% beträgt. Diese Versuche wurden in RIN 1046-38 Zellen durchgeführt (96). Buteau *et al.* beschrieben in INS-1 Zellen einen Anstieg der mRNA um 10-70% (97).

In vivo konnte ein erheblich größerer Einfluss von GLP-1 auf die IDX-1 Expression beobachtet werden. Stoffers *et al.* beschreiben im Mausmodell eine 4.6-fache Zunahme an IDX-1 Protein im Gesamtpankreas und Perfetti *et al.* eine vier bzw. sechsfache Zunahme an IDX-1 Protein in Pankreasinseln nach GLP-1 Injektion. Diese *in vivo* beobachtete deutliche Zunahme an IDX-1 Protein kann, wie oben beschrieben, im Zellmodell nicht bestätigt werden. Wurde ein ungeeignetes Zellmodell gewählt? INS-1 Zellen gelten allgemein als bestes

Zellmodell für adulte Betazellen, da sie viele charakteristische Eigenschaften der Betazelle über lange Zeit in physiologischem Maße beibehalten. Für die verwendeten INS-1 Zellen wurde bereits vielfach eine Stimulierbarkeit durch GLP-1 gezeigt. Ein Beispiel hierfür ist die Stimulation des Insulinpromotors durch GLP-1 mit den identischen Materialien (123). Im Zellmodell wird ausschließlich die Induktion von IDX-1 in Betazellen untersucht. Bei in vivo Experimenten hingegen beobachtet man neben einer Hochregulation von IDX-1 in Betazellen, auch den Einfluss von GLP-1 auf Betazellproliferation und Neogenese. Bei den in vivo Experimenten von Stoffers *et al.* wurde eine relative Zunahme der Betazellmasse innerhalb der Inseln beschrieben. Für diese Effekte kann also auch eine, durch Differenzierung und Proliferation ausgelöste, relative Zunahme von Betazellen innerhalb der Inseln verantwortlich sein. Die differenzierende Wirkung von GLP-1 auf duktale und andere Vorläuferzellen ist in vitro mehrfach beschrieben worden (87,124). Eine durch GLP-1 induzierte Proliferation oder Differenzierung von Vorläuferzellen zu IDX-1 positiven Zellen kann die Erhöhung des IDX-1 Protein oder mRNA Gehalts in Inselextrakten der Tiermodelle verursachen. GLP-1 ist wichtig für Differenzierung, Proliferation und Regeneration. Überträgt man die Beobachtungen aus INS-1 und RIN 1046-38 Zellmodellen auf adulte Betazellen, bleibt zu vermuten, dass die Expressionsregulation von IDX-1 durch GLP-1 in der Betazelle eine untergeordnete Rolle spielt.

5.3. Autoregulation des IDX-1 Promotors

Die Bedeutung eines konstanten IDX-1 Gehalts für die Funktion von Betazellen wurde eingangs bereits erläutert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Überexpression von IDX-1 in MIN6 Betazellen eine Suppression der IDX-1 Promotoraktivität bewirkt. In unserer Arbeitsgruppe stand ein rtTA System zur Verfügung, in dem die IDX-1 Expression über Doxycyclin gesteuert, mit Hilfe eines Antisense Ribozyms reduziert werden kann. Daten aus diesem rtTA System zeigen, dass Suppression von IDX-1 eine Aktivierung des IDX-1 Promotors bewirkt (Abbildung 33).

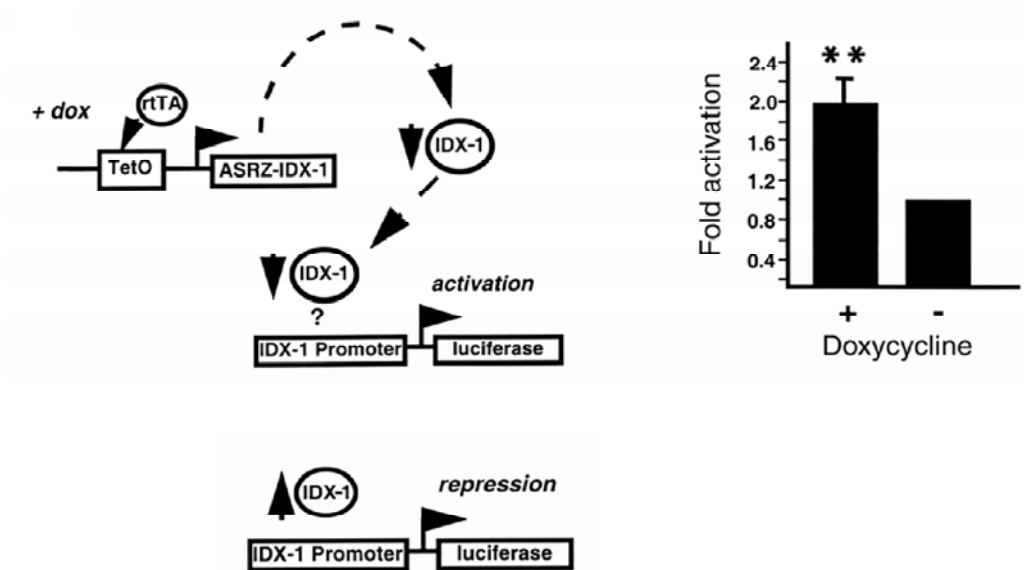


Abbildung 33: IDX-1 Promotoraktivierung als Antwort auf eine eingeschränkte IDX-1 Expression in rtTA System, modifiziert nach Thomas *et al.* (66).

Wir postulieren aus diesen Daten eine Autoregulation des IDX-1 Promotors durch IDX-1 im Sinne einer negativen Feedbackregulation. Dieser Regelkreis kann einen abnehmenden IDX-1 Gehalt wahrnehmen und gegensteuern, um so einem Funktionsverlust der Betazelle entgegenzuwirken. Diese Autoregulation kann sowohl durch IDX-1 selbst, als auch durch andere Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Der IDX-1 Promotor enthält mehrere AT-reiche Regionen, die als direkte Bindungsstelle für IDX-1 in Frage kommen. Marshak *et al.* und Gerrish *et al.* zeigten eine direkte Bindung von IDX-1 an ein solches Motiv des IDX-1 Promotors im Bereich der HNF3 β Bindungsstellen (99,125,126).

Marshak *et al.* beschrieben in NIH3T3 Zellen, die kein IDX-1 exprimieren, einen aktivierenden funktionellen Einfluss von IDX-1 auf den eigenen Promotor. Dies steht im Gegensatz zu unseren Beobachtungen in IDX-1 exprimierenden Betazellen. Möglicherweise findet in einem Betazellsystem, das IDX-1 exprimiert und IDX-1 unbedingt zur Aufrechterhaltung der Funktion benötigt,

eine andersartige Autoregulation statt, als in nicht Betazellen oder Zellen die sich erst zu einem IDX-1 exprimierendem Phänotyp entwickeln. Der Nachweis einer direkten Bindung von IDX-1 an seinen Promotor macht eine direkte Autoregulation wahrscheinlich.

Wir postulieren folgendes funktionelles System zu IDX-1 und Diabetes mellitus:

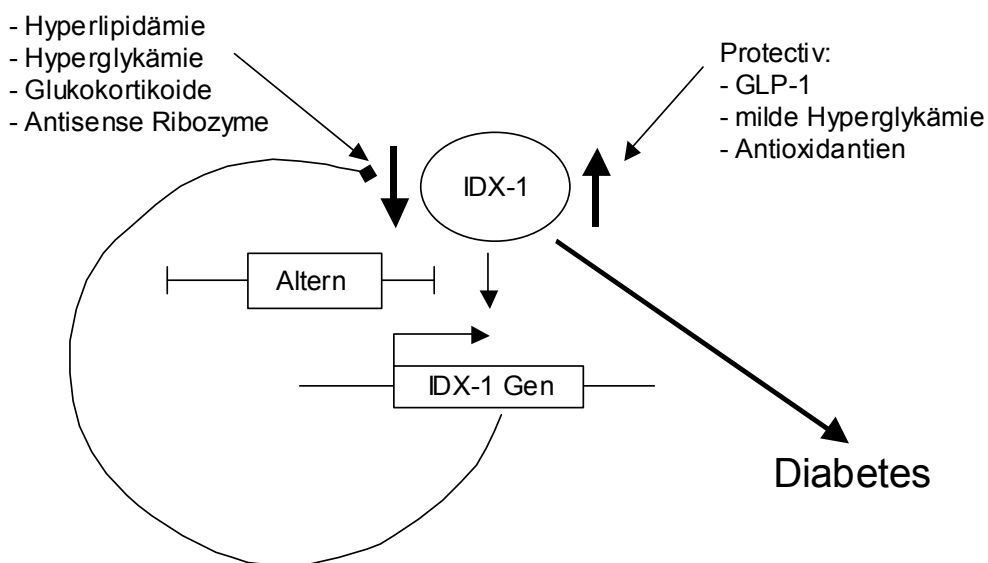


Abbildung 34: Schematische Darstellung der möglichen Zusammenhänge der IDX-1 Expression, diabetogenen Faktoren, Alter und der Entstehung des Diabetes mellitus.

IDX-1 ist ein Schlüsselfaktor für die Entwicklung und Funktion von Betazellen. Verminderte Expression von IDX-1 führt zu Diabetes mellitus. Zahlreiche diabetogene Faktoren, wie Hyperlipidämie, Hyperglykämie und Glukokortikoide bewirken eine verringerte Expression von IDX-1. Protektive Faktoren, wie GLP-1, milde Hyperglykämie und Antioxidantien bewirken eine verstärkte Expression von IDX-1.

Das IDX-1 Gen besitzt einen autoregulatorischen Feedbackmechanismus, der Schwankungen der IDX-1 Konzentration in Betazellen entgegenwirkt. Dieser Regelkreis könnte im Alter an Funktionsfähigkeit einbüßen und die Entwicklung von Diabetes mellitus begünstigen.

6. Zusammenfassung

Die Betazellmasse wird durch Apoptose, Proliferation und Neogenese aus Vorläuferzellen an den Bedarf des Organismus angepasst. Fehlregulationen und Verlust der Anpassungsfähigkeit sind Ursachen für Diabetes mellitus Typ-2. IDX-1 ist sowohl ein Hauptentwicklungsfaktor des embryonalen Pankreas als auch an der Regulation von Neogenese und Proliferation der adulten Betazellen beteiligt. Betazellproliferation und Differenzierung werden durch Faktoren wie GLP-1 oder milde Hyperglykämie stimuliert und gehen mit einer Aktivierung von IDX-1 einher.

In der Arbeit sollte der Einfluss von GLP-1 und milder Hyperglykämie auf die Expression, besonders die Transkription, des Transkriptionsfaktors IDX-1 in insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas untersucht werden. Ferner wurde eine mögliche Autoregulation des IDX-1 Promotors durch IDX-1 untersucht.

Als Modell für adulte Betazellen wurden klonale Betazellen INS-1 und MIN6 verwendet. Die IDX-1 Expression wurde auf mRNA Ebene im Northern Blot und auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Der Promotor des IDX-1 Gens wurde mithilfe von Luziferasereporterassays und EMSA untersucht.

Die Expression von IDX-1 Protein und mRNA wird durch milde Hyperglykämie stimuliert. Dieser Effekt ist auf eine Aktivierung des IDX-1 Promotors zurückzuführen. Die Aktivierung innerhalb des Promotors konnte auf zwei Regionen eingeschränkt werden. Diese befinden sich im IDX Promotor in den -900 bp bis -300 bp und den 230 bp vor Beginn der kodierenden Sequenz des IDX-1 Gens. Im EMSA konnte ein glukoseabhängiger Komplex (-49 bp bis -44 bp) nachgewiesen werden, an den USF-1 und USF-2 binden. USFs sind für glukoseabhängige Genregulation in Leber und Pankreas bekannt. Eine Mutation der Bindungsstelle führte zum Verlust des Bindungskomplexes. In Luziferasereporterassays beobachtete man eine Verringerung der

glukoseinduzierten Aktivierung. Für GLP-1 konnte kein eindeutiger Einfluss auf die Expression von IDX-1 gezeigt werden. Als Anzeichen für eine mögliche Autoregulation des IDX-1 Promotors durch IDX-1 wurde bei Überexpression von IDX-1 in Betazellen eine verringerte Promotoraktivität festgestellt.

Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor IDX-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Betazellmasse des endokrinen Pankreas. Es ist wichtig die molekularen Mechanismen der Regulation der Betazellmasse zu verstehen; Erkenntnisse darüber eröffnen einerseits ein besseres Verständnis der Pathogenese des Diabetes mellitus, andererseits stellen sie hoffnungsvolle neue Therapieansätze da.

7. Literaturverzeichnis

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**(7):1183-97. (1997).
2. Atkinson, M. A., and N. K. Maclaren. The Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* **331**(21):1428-1436 (1994).
3. Matthaei, S., M. Stumvoll, M. Kellerer, and H.-U. Haring. Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance. *Endocr Rev* **21**(6):585-618 (2000).
4. Mauvais-Jarvis, F., A. Virkamaki, M. Michael, J. Winnay, A. Zisman, R. Kulkarni, and C. Kahn. A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. *Diabetes* **49**(12):2126-2134 (2000).
5. Robertson, R. P., L. K. Olson, and H. J. Zhang. Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* **43**(9):1085-9. (1994).
6. Leahy, J. L., S. Bonner-Weir, and G. C. Weir. Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. *Diabetes Care* **15**(3):442-55. (1992).
7. Seufert, J., G. C. Weir, and J. F. Habener. Differential Expression of the Insulin Gene Transcriptional Repressor CCAAT/Enhancer-binding Protein beta and Transactivator Islet Duodenum Homeobox-1 in Rat Pancreatic beta Cells During the Development of Diabetes Mellitus. *J. Clin. Invest.* **101**(11):2528-2539 (1998).
8. Polonsky, K. S. Evolution of beta-cell dysfunction in impaired glucose tolerance and diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107 Suppl 4**:S124-7. (1999).
9. Arent, J. By the numbers. The facts about diabetes. *Healthplan* **41**(1):65-6. (2000).

10. Hauner, H. [Occurrence of diabetes mellitus in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* **123**(24):777-82. (1998).
11. Kohler, C., T. Temelkova-Kurktschiev, F. Schaper, K. Fucker, and M. Hanefeld. [Prevalence of newly diagnosed type 2 diabetes, impaired glucose tolerance and abnormal fasting glucose in a high risk population. Data from the RIAD study using new diagnostic criteria for diabetes]. *Dtsch Med Wochenschr* **124**(37):1057-61. (1999).
12. Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, S. E. Fowler, R. F. Hamman, J. M. Lachin, E. A. Walker, and D. M. Nathan. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **346**(6):393-403. (2002).
13. Eriksson, K. F., and F. Lindgarde. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia* **34**(12):891-8. (1991).
14. DeFronzo, R. A., and E. Ferrannini. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**(3):173-94. (1991).
15. Gustafsson, I., P. Hildebrandt, M. Seibaek, T. Melchior, C. Torp-Pedersen, L. Kober, and P. Kaiser-Nielsen. Long-term prognosis of diabetic patients with myocardial infarction: relation to antidiabetic treatment regimen. The TRACE Study Group. *Eur Heart J* **21**(23):1937-43. (2000).
16. Casiglia, E., G. Zanette, A. Mazza, V. Donadon, C. Donada, A. Pizziol, V. Tikhonoff, P. Palatini, and A. C. Pessina. Cardiovascular mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A controlled study among 683 diabetics and 683 age- and sex-matched normal subjects. *Eur J Epidemiol* **16**(7):677-84. (2000).
17. Department of Health and Human Services, C. f. D. C. a. P. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States,

2000. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA: U.S. (2002).
18. Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbitt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, and R. V. Rajotte. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* **343**(4):230-8. (2000).
 19. Bonner-Weir, S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* **141**(6):1926-9. (2000).
 20. Scaglia, L., F. E. Smith, and S. Bonner-Weir. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* **136**(12):5461-8. (1995).
 21. Bruning, J. C., J. Winnay, S. Bonner-Weir, S. I. Taylor, D. Accili, and C. R. Kahn. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* **88**(4):561-72. (1997).
 22. Bernard, C., M. F. Berthault, C. Saulnier, and A. Ktorza. Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *Faseb J* **13**(10):1195-205. (1999).
 23. Blume, N., J. Skouv, L. I. Larsson, J. J. Holst, and O. D. Madsen. Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are associated with pancreatic apoptosis. *J Clin Invest* **96**(5):2227-35. (1995).
 24. Bonner-Weir, S., L. A. Baxter, G. T. Schupp, and F. E. Smith. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* **42**(12):1715-20. (1993).
 25. Bonner-Weir, S., M. Taneja, G. C. Weir, K. Tatarkiewicz, K. H. Song, A. Sharma, and J. J. O'Neil. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14):7999-8004. (2000).
 26. Abraham, E. J., C. A. Leech, J. C. Lin, H. Zulewski, and J. F. Habener. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human

- pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* **143**(8):3152-61. (2002).
27. Leonard, J., B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, and M. R. Montminy. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* **7**(10):1275-83. (1993).
28. Ohlsson, H., K. Karlsson, and T. Edlund. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* **12**(11):4251-9. (1993).
29. MacFarlane, W. M., M. L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, and K. Docherty. Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem J* **303**(Pt 2):625-31. (1994).
30. Offield, M. F., T. L. Jetton, P. A. Labosky, M. Ray, R. W. Stein, M. A. Magnuson, B. L. Hogan, and C. V. Wright. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**(3):983-95. (1996).
31. Marshak, S., H. Totary, E. Cerasi, and D. Melloul. Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26):15057-62. (1996).
32. Miller, C. P., R. E. McGehee, Jr., and J. F. Habener. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* **13**(5):1145-56. (1994).
33. McGinnis, W., and R. Krumlauf. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**(2):283-302. (1992).
34. Lu, M., C. Miller, and J. F. Habener. Functional regions of the homeodomain protein IDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene. *Endocrinology* **137**(7):2959-67. (1996).

35. Milewski, W. M., S. J. Duguay, S. J. Chan, and D. F. Steiner. Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology* **139**(3):1440-9. (1998).
36. Wright, C. V., P. Schnegelsberg, and E. M. De Robertis. XIHbox 8: a novel *Xenopus* homeo protein restricted to a narrow band of endoderm. *Development* **105**(4):787-94 (1989).
37. Peers, B., J. Leonard, S. Sharma, G. Teitelman, and M. R. Montminy. Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* **8**(12):1798-806. (1994).
38. Peshavaria, M., E. Henderson, A. Sharma, C. V. Wright, and R. Stein. Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* **17**(7):3987-96. (1997).
39. Shushan, E. B., E. Cerasi, and D. Melloul. Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol* **18**(6):471-9. (1999).
40. Hessabi, B., P. Ziegler, I. Schmidt, C. Hessabi, and R. Walther. The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *Eur J Biochem* **263**(1):170-7. (1999).
41. Moede, T., B. Leibiger, H. G. Pour, P. Berggren, and I. B. Leibiger. Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* **461**(3):229-34. (1999).
42. Waeber, G., N. Thompson, P. Nicod, and C. Bonny. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* **10**(11):1327-34. (1996).
43. Carty, M. D., J. S. Lillquist, M. Peshavaria, R. Stein, and W. C. Soeller. Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **272**(18):11986-93. (1997).

44. Watada, H., Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, and Y. Yamasaki. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* **45**(11):1478-88. (1996).
45. Habener, J. F., and D. A. Stoffers. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* **110**(1):12-21. (1998).
46. Stanojevic, V., J. F. Habener, and M. K. Thomas. Pancreas Duodenum Homeobox-1 (PDX-1) Transcriptional Activation Requires Interactions with p300. *Endocrinology* (2004).
47. Guz, Y., M. R. Montminy, R. Stein, J. Leonard, L. W. Gamer, C. V. Wright, and G. Teitelman. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* **121**(1):11-8. (1995).
48. Edlund, H. Pancreas: how to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol* **11**(6):663-8. (1999).
49. Kemp, D. M., M. K. Thomas, and J. F. Habener. Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Rev Endocr Metab Disord* **4**(1):5-17. (2003).
50. Stoffers, D. A., R. S. Heller, C. P. Miller, and J. F. Habener. Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* **140**(11):5374-81. (1999).
51. Jonsson, J., L. Carlsson, T. Edlund, and H. Edlund. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**(6498):606-9. (1994).
52. Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* **122**(5):1409-16. (1996).

53. Stoffers, D. A., N. T. Zinkin, V. Stanojevic, W. L. Clarke, and J. F. Habener. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* **15**(1):106-10. (1997).
54. Finegood, D. T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* **44**(3):249-56. (1995).
55. Sharma, A., D. H. Zangen, P. Reitz, M. Taneja, M. E. Lissauer, C. P. Miller, G. C. Weir, J. F. Habener, and S. Bonner-Weir. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* **48**(3):507-13. (1999).
56. Kacsoh, B. *Endocrine Physiology*. McGraw-Hill Medical Publishing, New York (2000).
57. Zhou, J., X. Wang, M. A. Pineyro, and J. M. Egan. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* **48**(12):2358-66. (1999).
58. Zhou, J., M. A. Pineyro, X. Wang, M. E. Doyle, and J. M. Egan. Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol* **192**(3):304-14 (2002).
59. Ferber, S., A. Halkin, H. Cohen, I. Ber, Y. Einav, I. Goldberg, I. Barshack, R. Seijffers, J. Kopolovic, N. Kaiser, and A. Karasik. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* **6**(5):568-72. (2000).
60. Stoffers, D. A., J. Ferrer, W. L. Clarke, and J. F. Habener. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* **17**(2):138-9. (1997).
61. Macfarlane, W. M., T. M. Frayling, S. Ellard, J. C. Evans, L. I. Allen, M. P. Bulman, S. Ayres, M. Shepherd, P. Clark, A. Millward, A. Demaine, T. Wilkin, K. Docherty, and A. T. Hattersley. Missense mutations in the

- insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* **104**(9):R33-9. (1999).
62. Hani, E. H., D. A. Stoffers, J. C. Chevre, E. Durand, V. Stanojevic, C. Dina, J. F. Habener, and P. Froguel. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**(9):R41-8. (1999).
63. Ahlgren, U., J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu, and H. Edlund. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* **12**(12):1763-8. (1998).
64. Dutta, S., S. Bonner-Weir, M. Montminy, and C. Wright. Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature* **392**(6676):560. (1998).
65. Lottmann, H., J. Vanselow, B. Hessabi, and R. Walther. The Tet-On system in transgenic mice: inhibition of the mouse *pdx-1* gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells. *J Mol Med* **79**(5-6):321-8. (2001).
66. Thomas, M. K., O. N. Devon, J. H. Lee, A. Peter, D. A. Schlosser, M. S. Tenser, and J. F. Habener. Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* **108**(2):319-29. (2001).
67. Olson, L. K., A. Sharma, M. Peshavaria, C. V. Wright, H. C. Towle, R. P. Rodertson, and R. Stein. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20):9127-31. (1995).
68. Sharma, A., D. Fusco-DeMane, E. Henderson, S. Efrat, and R. Stein. The role of the insulin control element and RIPE3b1 activators in glucose-stimulated transcription of the insulin gene. *Mol Endocrinol* **9**(11):1468-76. (1995).
69. ---
70. Lu, M., J. Seufert, and J. F. Habener. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding

- protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem* **272**(45):28349-59. (1997).
71. Harmon, J. S., Y. Tanaka, L. K. Olson, and R. P. Robertson. Reconstitution of glucotoxic HIT-T15 cells with somatostatin transcription factor-1 partially restores insulin promoter activity. *Diabetes* **47**(6):900-4. (1998).
72. Gremlich, S., C. Bonny, G. Waeber, and B. Thorens. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* **272**(48):30261-9. (1997).
73. Sharma, S., U. S. Jhala, T. Johnson, K. Ferreri, J. Leonard, and M. Montminy. Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol* **17**(5):2598-604. (1997).
74. Wu, K. L., M. Gannon, M. Peshavaria, M. F. Offield, E. Henderson, M. Ray, A. Marks, L. W. Gamer, C. V. Wright, and R. Stein. Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol Cell Biol* **17**(10):6002-13. (1997).
75. Harmon, J. S., C. E. Gleason, Y. Tanaka, E. A. Oseid, K. K. Hunter-Berger, and R. P. Robertson. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* **48**(10):1995-2000. (1999).
76. Tanaka, Y., C. E. Gleason, P. O. Tran, J. S. Harmon, and R. P. Robertson. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19):10857-62. (1999).
77. Kaneto, H., Y. Kajimoto, J. Miyagawa, T. Matsuoka, Y. Fujitani, Y. Umayahara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Y. Yamasaki, and M. Hori. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* **48**(12):2398-406. (1999).
78. Roche, E., F. Assimacopoulos-Jeannet, L. A. Witters, B. Perruchoud, G. Yaney, B. Corkey, M. Asfari, and M. Prentki. Induction by glucose of

- genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* **272**(5):3091-8. (1997).
79. Webb, G. C., M. S. Akbar, C. Zhao, and D. F. Steiner. Expression profiling of pancreatic beta cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11):5773-8. (2000).
80. Macfarlane, W. M., R. M. Shepherd, K. E. Cosgrove, R. F. James, M. J. Dunne, and K. Docherty. Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca²⁺. *Diabetes* **49**(3):418-23. (2000).
81. Macfarlane, W. M., C. M. McKinnon, Z. A. Felton-Edkins, H. Cragg, R. F. James, and K. Docherty. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **274**(2):1011-6. (1999).
82. Petersen, H. V., M. Peshavaria, A. A. Pedersen, J. Philippe, R. Stein, O. D. Madsen, and P. Serup. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* **431**(3):362-6. (1998).
83. Kieffer, T. J., and J. F. Habener. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* **20**(6):876-913. (1999).
84. Drucker, D. J. Glucagon-like peptides. *Diabetes* **47**(2):159-69. (1998).
85. Holz, G. G. t., W. M. Kuhlreiber, and J. F. Habener. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* **361**(6410):362-5. (1993).
86. McIntyre, N., C. D. Holdsworth, and D. S. Turner. New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. *Lancet* **41**:20-1 (1964).
87. Hui, H., C. Wright, and R. Perfetti. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* **50**(4):785-96. (2001).
88. Deacon, C. F., A. H. Johnsen, and J. J. Holst. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated

- peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(3):952-7 (1995).
89. Mentlein, R., B. Gallwitz, and W. E. Schmidt. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* **214**(3):829-35 (1993).
90. Pauly, R. P., F. Rosche, M. Wermann, C. H. McIntosh, R. A. Pederson, and H. U. Demuth. Investigation of glucose-dependent insulintropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J Biol Chem* **271**(38):23222-9 (1996).
91. Kieffer, T. J., C. H. McIntosh, and R. A. Pederson. Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* **136**(8):3585-96 (1995).
92. Meier, J. J., B. Gallwitz, S. Salmen, O. Goetze, J. J. Holst, W. E. Schmidt, and M. A. Nauck. Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(6):2719-25. (2003).
93. D'Alessio, D. A., S. E. Kahn, C. R. Leusner, and J. W. Ensink. Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J Clin Invest* **93**(5):2263-6 (1994).
94. D'Alessio, D. A., R. L. Prigeon, and J. W. Ensink. Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes. A physiological role of glucagon-like peptide I. *Diabetes* **44**(12):1433-7 (1995).
95. Meneilly, G. S., C. H. McIntosh, R. A. Pederson, J. F. Habener, R. Gingerich, J. M. Egan, and D. Elahi. Glucagon-like Peptide-1 (7-37)

- Augments Insulin-Mediated Glucose Uptake in Elderly Patients With Diabetes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**(11):M681-M685. (2001).
96. Wang, X., C. M. Cahill, M. A. Pineyro, J. Zhou, M. E. Doyle, and J. M. Egan. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* **140**(10):4904-7. (1999).
97. Buteau, J., R. Roduit, S. Susini, and M. Prentki. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* **42**(7):856-64. (1999).
98. Sharma, S., J. Leonard, S. Lee, H. D. Chapman, E. H. Leiter, and M. R. Montminy. Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J Biol Chem* **271**(4):2294-9. (1996).
99. Ben-Shushan, E., S. Marshak, M. Shoshkes, E. Cerasi, and D. Melloul. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem* **276**(20):17533-40. (2001).
100. Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. A. Halban, and C. B. Wollheim. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**(1):167-78. (1992).
101. Seijffers, R., O. Ben-David, Y. Cohen, A. Karasik, M. Berezin, C. B. Newgard, and S. Ferber. Increase in PDX-1 levels suppresses insulin gene expression in RIN 1046- 38 cells. *Endocrinology* **140**(7):3311-7. (1999).
102. Miyazaki, J., K. Araki, E. Yamato, H. Ikegami, T. Asano, Y. Shibasaki, Y. Oka, and K. Yamamura. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**(1):126-32. (1990).

103. Seufert, J., T. J. Kieffer, and J. F. Habener. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2):674-9 (1999).
104. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259):680-5 (1970).
105. Stoffers, D. A., V. Stanojevic, and J. F. Habener. Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J Clin Invest* **102**(1):232-41. (1998).
106. Chomczynski, P., and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1):156-9 (1987).
107. Brown. Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996).
108. Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W. Schaffner. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**(15):6419. (1989).
109. Heinemeyer, T., E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A. E. Kel, O. V. Kel, E. V. Ignatieva, E. A. Ananko, O. A. Podkolodnaya, F. A. Kolpakov, N. L. Podkolodny, and N. A. Kolchanov. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**(1):362-7. (1998).
110. Olson, L. K., J. Qian, and V. Poytout. Glucose rapidly and reversibly decreases INS-1 cell insulin gene transcription via decrements in STF-1 and C1 activator transcription factor activity. *Mol Endocrinol* **12**(2):207-19. (1998).
111. Lacronique, V., S. Lopez, L. Miquerol, A. Porteu, A. Kahn, and M. Raymondjean. Identification and functional characterization of an erythroid-specific enhancer in the L-type pyruvate kinase gene. *J Biol Chem* **270**(25):14989-97. (1995).
112. Kennedy, H. J., B. Viollet, I. Rafiq, A. Kahn, and G. A. Rutter. Upstream stimulatory factor-2 (USF2) activity is required for glucose stimulation of

- L-pyruvate kinase promoter activity in single living islet beta-cells. *J Biol Chem* **272**(33):20636-40. (1997).
113. Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, M. Bonham, J. Bisi, and L. Babiss. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol* **15**(5):2782-90. (1995).
114. Kaytor, E. N., H. Shih, and H. C. Towle. Carbohydrate regulation of hepatic gene expression. Evidence against a role for the upstream stimulatory factor. *J Biol Chem* **272**(11):7525-31. (1997).
115. Kaytor, E. N., J. Qian, H. C. Towle, and L. K. Olson. An indirect role for upstream stimulatory factor in glucose-mediated induction of pyruvate kinase and S14 gene expression. *Mol Cell Biochem* **210**(1-2):13-21. (2000).
116. Portois, L., B. Maget, M. Tastenoy, J. Perret, and M. Svoboda. Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem* **274**(12):8181-90. (1999).
117. Vallet, V. S., A. A. Henrion, D. Bucchini, M. Casado, M. Raymondjean, A. Kahn, and S. Vaulont. Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 *-/-* mice. *J Biol Chem* **272**(35):21944-9. (1997).
118. Vallet, V. S., M. Casado, A. A. Henrion, D. Bucchini, M. Raymondjean, A. Kahn, and S. Vaulont. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* **273**(32):20175-9. (1998).
119. Han, S. Y., J. C. Kim, J. M. Suh, and I. K. Chung. Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2. *FEBS Lett* **505**(1):57-62. (2001).
120. North, S., X. Espanel, F. Bantignies, B. Viollet, V. Vallet, P. Jalinot, G. Brun, and G. Gillet. Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). *Oncogene* **18**(11):1945-55. (1999).
121. Breen, G. A., and E. M. Jordan. Transcriptional activation of the F(1)F(0) ATP synthase alpha-subunit initiator element by USF2 is mediated by p300. *Biochim Biophys Acta* **1428**(2-3):169-76. (1999).

122. Qian, J., E. N. Kaytor, H. C. Towle, and L. K. Olson. Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem J* **341**(Pt 2):315-22. (1999).
123. Kemp, D. M., and J. F. Habener. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **142**(3):1179-87. (2001).
124. Perfetti, R., J. Zhou, M. E. Doyle, and J. M. Egan. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* **141**(12):4600-5. (2000).
125. Gerrish, K. E., M. A. Cissell, and R. Stein. The role of hepatic nuclear factor 1a and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem* **5**:5 (2001).
126. Marshak, S., E. Benshushan, M. Shoshkes, L. Havin, E. Cerasi, and D. Melloul. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* **20**(20):7583-90 (2000).

8. Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP β	CCAAT/Enhancer Binding Protein β
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB-Binding Protein
cDNA	komplementäre DNA
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
D	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
e14	Tag der Embryonalentwicklung (14)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
FBS	fetales Rinderserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDB	Gel Delay Buffer
GFP	Green Fluorescent Protein

Abkürzungsverzeichnis

GIP	Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLUT-2	Glukose Transporter-2
GRE	glukoseresponsives Element
GSF	Glucose Sensitive Factor
h	Stunde
HD	Homeo-Domäne
HEPES	n-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure
HNF-3 β	Hepatocyte Nuclear Factor-3 β
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IDX-1	Islet /Duodenum Homeobox-1
IPF-1	Insulin Promoter Factor-1
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
IUF-1	Insulin Promoter Upstream Factor-1
kb	Kilobasen, 1000 Basen
kD	Kilodalton
Kir 6.2	Inward Rectifying K ⁺ -channel 6.2 (ATP-sensitiv)
konz.	Konzentriert
KP	Kalium Phosphat Puffer
lacZ	β -Galactosidase
L-PK	L- Pyruvatkinase
min	Minute(n)
MODY	Maturity Onset Diabetes Mellitus of the Young
MOPS	3-(N-morpholino)propane Sulfonate
mRNA	Messenger-RNA
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese Elektrophore
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDX-1	Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene 1
PFK-1	Phosphofruktokinase-1
PH	pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PP	pankreatisches Polypeptid
RIP I	Ratten Insulin Promotor I
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
rtTA	reverse tetracycline Transaktivator
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
STF-1	Somatostatin Transcription Faktor
SUR 1	Sulfonylharnstoff Rezeptor 1
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/ EDTA
TEMED	NNNN-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trometamol (Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan)
U	Unit
USF	Upstream Stimulatory Factor
ZNS	Zentralnervensystem

9. Lebenslauf

Andreas Peter

Persönliche Daten

Geburtstag: 16. Dezember 1975

Geburtsort: Essen, Deutschland

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Ausbildung

1982 - 1986 Karl-Ernst-Osthaus-Grundschule in Hagen

1986 - 1995 Theodor-Heuss-Gymnasium in Hagen;

1995 - 1996 Zivildienst: Kranken- und intensivmedizinische Pflege
Evangelisches Krankenhaus Hagen-Haspe

Studium

Okt 96- Nov 03 Medizinstudium an der Universität Würzburg

Sep 98 Physikum

Sep 99 1.Staatsexamen

Sep 99- Okt 00 Forschungsaufenthalt im Laboratory of Molecular
Endocrinology (Joel F. Habener, MD), Massachusetts
General Hospital, Harvard Medical School, Boston,
USA

Sep 02 2.Staatsexamen

Nov 03 3.Staatsexamen

Lebenslauf

Praktisches Jahr

Okt 02- Dez 02	Gefäßchirurgie, Royal Prince Alfred Hospital, Central Clinical School, Sydney University, Australien
Dez 02- Feb 03	Allgemeinchirurgie, Royal Nepal Medical College Teaching Hospital, Kathmandu University, Nepal
Feb 03- Jun 03	Radiologie, Institut für Röntgendiagnostik der Universität Würzburg
Jun 03- Sep 03	Innere Medizin, Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz

Sonstiges

Feb 90	Preisträger in Chemie im Wettbewerb "Jugend forscht "
Nov 98- Jul 99	studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Physiologie II als Praktikumsassistent
Nov 00- Apr 04	Nebentätigkeit als wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Jochen Seufert.

Berufliche Tätigkeit:

seit April 2004	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II (Direktor: Prof. Dr. med. J.Mössner), Universität Leipzig
-----------------	---

Leipzig, den 7.2.2005

Bisherige Publikation

Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1

Melissa K. Thomas, Octavia N. Devon, Jee H. Lee, Andreas Peter, David A. Schlosser, Matthew S. Tenser, and Joel F. Habener

J. Clin. Invest. 108:319–329 (2001)

The proliferation associated protein P8 interacts with a novel splice variant of the DEAD box RNA helicase DDX18 in pancreatic beta-cells

A. Opel, A. Peter, G. Päß, F. Jakob, J. Seufert

Exp Clin Endocrinol Diabetes 2003 ;111 ; Suppl 1: S15-S16

The proliferation associated protein P8 interacts with a novel splice variant of the DEAD box RNA helicase DDX18 in pancreatic beta-cells

Opel A., Peter A., Päß G., Jakob F., Seufert J.

Diabetes und Stoffwechsel 12, Suppl1: S73(2003)

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr.med. Jochen Seufert bedanken, für die stets hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Sein vorbildliches Engagement, seine Förderung und seine Hilfe ermöglichten das Erstellen dieser Arbeit und weckten mein Interesse an der Forschung. Dank gebührt ebenfalls der kompletten Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jochen Seufert, für ein angenehmes Arbeitsklima, sowie für technische und fachliche Ratschläge. Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs möchte ich mich bedanken, dass sie sich bereit erklärte, das Koreferat zu übernehmen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Joel F. Habener, MD, Chef des Laboratory of Molecular Endocrinology bedanken, der mir durch die großzügige Aufnahme in sein Labor den Forschungsaufenthalt in Boston ermöglichte. Des weiteren möchte ich mich bei Frau Melissa Thomas, MD/ PhD bedanken, die mich während dieser Zeit hervorragend betreute; dies gilt auch für die übrigen Mitglieder des Labors, die mich freundschaftlich aufnahmen und durch fachliche Diskussionen einen großen Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihre persönliche und finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit und meines Studiums. Abschließend möchte ich noch Frau Silke Getzlaff danken, die mir während den Höhen und Tiefen der Dissertation immer liebevoll und geduldig zur Seite stand.