

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

**Etablierung eines  
hochsensitiven liposomalen Transfektionssystems  
zur Untersuchung der Aktivität  
des humanen Insulingenpromotors  
in  $\beta$ -Zelllinien und primären  $\beta$ -Zellen des endokrinen  
Pankreas des Menschen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Silke Hohloch  
aus  
Reutlingen

Würzburg, Oktober 2008

Referent: Prof. Dr. med. J. Seufert

Koreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

1.1.	Diabetes mellitus	01
1.2.	Bildung, Speicherung und Freisetzung von Insulin	03
1.3.	Effekte von Hormonen & Nährstoffen auf die Insulingenexpression	04
1.4.	Transkriptionelle Regulation der Insulingenexpression	07
1.5.	Fragestellung und Ziel der Arbeit	09

### **2. Materialien**

2.1.	Chemikalien und weitere Reagenzien	11
2.2.	Plasmide	12
2.3.	Enzyme	15
2.4.	Oligonukleotid-Primer	15
2.5.	Transfektionsreagenzien	16
2.6.	Zelllinien	16
2.7.	Zellkulturmedien	17
2.8.	Reagenziensätze (Kits)	17
2.9.	Bakterien	18
2.10.	Bakterienmedien	18
2.11.	Puffer	18
2.12.	Elektrophorese von DNA	19
2.13.	Geräteliste, Verbrauchsmaterialien und Software	19

### **3. Methoden**

3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.2.	TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese	22
3.3.	Konzentrationsmessung von Nukleinsäureproben	23
3.4.	Methoden zum Klonieren eines Plasmids	23
3.4.1.	Enzymatische Reaktionen	23

3.4.2.	Verdau von Insert und Vektor mit Restriktionsenzymen	24
3.4.3.	Auffüllen von Überhängen mit Klenow-Polymerase	24
3.4.4.	Dephosphorylieren mit alkalischer Phosphatase	25
3.4.5.	Ligation von Insert und Vektor	26
3.4.6.	Ligation mit dem TOPO <sup>TM</sup> TA Cloning Kit	26
3.5.	Extraktion von DNA aus einem Gel	27
3.6.	Herstellung ultrakompetenter Bakterien für den DNA-Transfer mittels Hitzeschocktransformation	27
3.7.	Transformation durch Hitzeschock	28
3.8.	Ausplattieren der Bakterien und Picken von Klonen	28
3.9.	Glyceroldauerkulturen	28
3.10.	Mini-DNA-Präparation	29
3.11.	Mini-Monster-DNA-Präparation	29
3.12.	DNA-Sequenzierung	29
3.12.1.	Sequenzierungs-PCR	29
3.12.2.	Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung	30
3.12.3.	Sequenzierung	31
3.13.	Klonieren des Plasmids p-336hInsP-SEAP	31
3.14.	Klonieren der 5'-Deletionskonstrukte des humanen Insulingenpromotors	32
3.15.	Durchführung des SEAP-Assays	37
3.15.1.	Vorbereitung der Proben	37
3.15.2.	Durchführung des Assays	37
3.16.	Zellkultur	37
3.16.1.	Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	38
3.16.2.	Transfektion von INS-1-β- und beta-TC3-Zellen mit Metafectene <sup>®</sup>	38
3.16.3.	Transfektion von humanen Inselzellen mit Metafectene <sup>®</sup> , Fugene <sup>®</sup> , ExGen500 <sup>®</sup> , Superfect <sup>®</sup> , Lipofectamine <sup>®</sup> oder Effectene <sup>®</sup>	39
3.17.	Statistik	39

## **4. Ergebnisse**

- |      |  |    |
|------|--|----|
| 4.1. | Etablierung eines Systems zur hochsensitiven Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors | 40 |
| 4.2. | Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit Deletionskonstrukten                                   | 42 |
| 4.2. | Transfektion von beta-TC3-Zellen mit Deletionskonstrukten  | 47 |
| 4.3. | Transfektion von primären humanen $\beta$ -Zellen  | 50 |

## **5. Diskussion**

- |      |  |    |
|------|--|----|
| 5.1. | Etablierung eines Systems zur hochsensitiven Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors | 52 |
| 5.2. | Testung der Deletionskonstrukte in INS-1- und beta-TC3-Zellen                                      | 53 |
| 5.3  | Ausblick   | 54 |

## **6. Zusammenfassung** 55

## **7. Literatur** 57

## **8. Danksagung**

## **9. Lebenslauf**

## 1. Einleitung

### 1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der es durch Störung der Insulinsekretion und/oder der Wirkung des Insulins zu einer Dysregulation des Glukosestoffwechsels kommt. Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Erkrankungen in den westlichen Industrieländern. Die Prävalenz hat in Deutschland, wie in den meisten anderen Industrienationen auch, in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Sie betrug im Jahr 1998 5,9% und im Jahr 2004 7,9% (1). Dabei handelt es sich bei über 90% der betroffenen Patienten um einen Diabetes mellitus Typ 2 und nur bei etwa 5% um einen Diabetes mellitus Typ 1 (2).

Seit 1997 wird der Diabetes mellitus nach den durch die American Diabetes Association erarbeiteten Klassifikationskriterien eingeteilt, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) offiziell anerkannt, und von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) übernommen wurden.

Dabei wird der Diabetes mellitus Typ 1 abgegrenzt, der sich in der Mehrzahl der Fälle vor dem 35. Lebensjahr manifestiert, grundsätzlich aber in jedem Lebensalter auftreten kann (2). Bei dieser Form besteht ein absoluter Insulinmangel, hervorgerufen durch die meist autoimmunologische, selten idiopathische Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas. Typ 1-Diabetiker sind zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutzuckerspiegels ihr Leben lang auf eine Insulintherapie angewiesen. Komplizierte Therapieschemata verlangen von den Patienten ein hohes Maß an Wissen und die Bereitschaft zur Mitarbeit bei diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen. Pankreas- und Inselzelltransplantationen als alternative Therapieformen sind für den Routineeinsatz derzeit noch nicht geeignet. Aus methodischer Sicht ist die Ausbeute an Inselzellen mit den derzeitigen Isolierungsprotokollen nicht optimal. In nur wenigen Fällen ist bisher eine

Insulinfreiheit des Patienten nach Transplantation von Inselzellen aus einem einzigen Spenderorgan gelungen (3). Durch die nach der Transplantation erforderliche Immunsuppression wird in den meisten Fällen keine vollständige Unterdrückung des Autoimmunprozesses erreicht. Außerdem beeinträchtigen einige etablierte Immunsuppressiva die Funktion der Inselzellen oder die Wirkung des Insulins (4, 5).

Weiter erfolgt die Abgrenzung des Diabetes mellitus Typ 2, der sich zumeist erst nach dem 35. Lebensjahr manifestiert (2). Von den über 60-jährigen ist etwa jeder Fünfte von dieser Erkrankung betroffen. Diese Form des Diabetes mellitus ist sowohl durch die Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen mit gestörter Insulinsekretion als auch durch die Insulinresistenz der peripheren Zielgewebe wie Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe und durch den Verlust von bis zu 60% der  $\beta$ -Zellen gekennzeichnet (6, 7, 8).

Beim Vorhandensein eines klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 2 geht man heutzutage von einer multifaktoriellen Genese aus, die durch das gleichzeitige Vorliegen von oben genannter peripherer Insulinresistenz, Insulinsekretionsstörung und prädisponierenden Faktoren wie Adipositas, fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel bedingt ist (2). Auch ein genetischer Hintergrund scheint von Bedeutung zu sein (9, 10, 11, 12, 13, 14).

Die periphere Insulinresistenz kann lange Zeit durch eine kompensatorisch erhöhte Insulinsekretion ausgeglichen werden. Therapeutisch wichtig in Frühstadien ist die Ausschaltung der Risikofaktoren und diätetische Ernährung. In späteren Stadien eignen sich zusätzlich orale Antidiabetika oder Insulin zur Therapie.

Bei beiden Formen sind regelmäßige Patientenschulungen und -kontrollen unerlässlich. Die Vermeidung von Hypo- und Hyperglykämien dient vor allem der Prophylaxe von Spätkomplikationen wie diabetischer Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie, sowie Makro- und Mikroangiopathie.

Vom Diabetes mellitus Typ 1 und 2 werden weitere Formen wie der Gestationsdiabetes sowie spezifische Diabetes-Typen unterschieden, zu denen unter anderem genetische Defekte der  $\beta$ -Zellen (z.B. MODY Typen 1-6, mitochondrialer Diabetes), Endokrinopathien (z.B. Akromegalie, Cushing-

Syndrom), Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. zystische Fibrose, Pankreas-Tumoren, Pankreatitis) und auch durch Chemikalien oder Medikamente induzierte Formen zählen.

## **1.2. Bildung, Speicherung und Freisetzung von Insulin**

Insulin besteht aus zwei Peptidketten, einer A-Kette aus 21 Aminosäuren und einer B-Kette aus 30 Aminosäuren. In den meisten Spezies existiert ein einziges Gen für Präproinsulin, Maus und Ratte besitzen jedoch jeweils zwei dieser Gene. Das humane Insulingen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (p15.5) lokalisiert (15) und enthält drei Exons und zwei Introns (16).

Die mRNA wird zunächst in das Präproinsulin (107 Aminosäuren) translatiert, das aus einem Signalpeptid, einer B-Kette, dem C-Peptid (*connective peptide*) und einer A-Kette besteht. Aus dem Präproinsulin entsteht durch die Abspaltung des Signalpeptids das Proinsulin (81 Aminosäuren). Proinsulin wird durch Herauslösung des C-Peptids, das die Aminosäure 1 der A-Kette mit der Aminosäure 30 der B-Kette verbindet, und durch die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den Ketten zum biologisch aktiven Insulin (17).

Die Insulinmoleküle werden in den Vesikeln des Golgi-Apparats, der an der Zellmembran der  $\beta$ -Zelle liegt durch Zink-Ionen zu Hexameren gebunden und so stabilisiert gespeichert. Insulin ist in der Form von Hexameren nicht wirksam, sondern erst als Einzelmolekül.

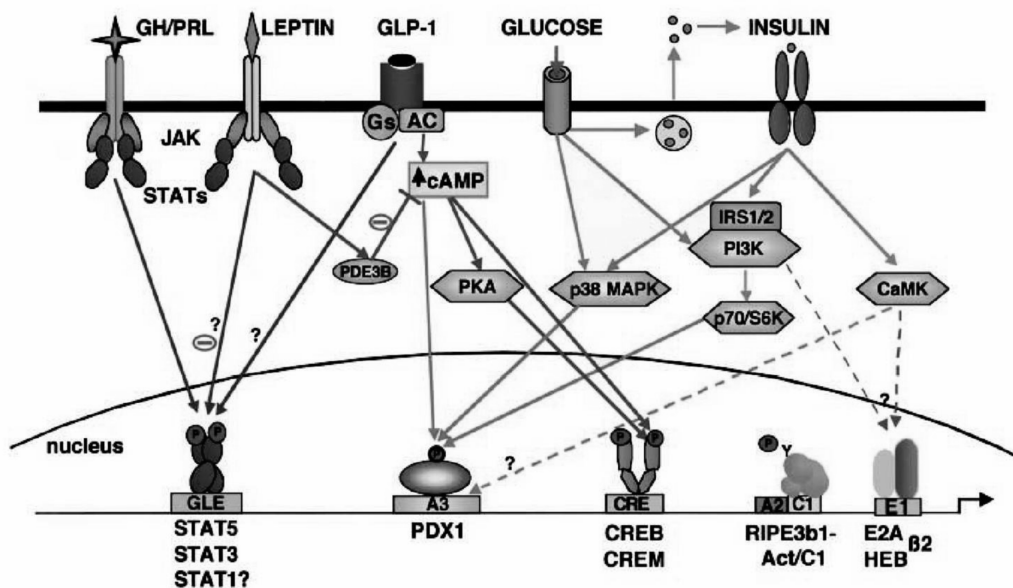
Der wichtigste direkte Reiz zur Ausschüttung des Insulins aus der  $\beta$ -Zelle ist der Anstieg der Blutglukosekonzentration. Daneben wirkt die Anwesenheit verschiedener Aminosäuren, freier Fettsäuren und einiger Hormone stimulierend auf die Insulinfreisetzung (siehe hierzu auch 1.3.).

Die Insulinproduktion wird auf verschiedenen Stufen von der Insulingen-Transkription bis zur Insulinsekretion reguliert. Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf die transkriptionelle Regulation.



### 1.3. Effekte von Hormonen & Nährstoffen auf die Insulingenexpression

Die Regulation des Insulingenpromotors erfolgt durch spezifische Interaktionen zwischen DNA-Elementen und Transkriptionsfaktoren, welche durch unterschiedliche Hormone und Nährstoffe beeinflusst werden. Dies geschieht hauptsächlich über Kinase-abhängige Signaltransduktionswege (Abb.1.1.). Von diesen Stoffen und Signaltransduktionswegen sind im Folgenden einige wichtige dargestellt.



**Abb.1.1.: Proinsulingen-Transkription als Antwort auf unterschiedliche Signale.** Die Abbildung zeigt mögliche Signaltransduktionswege und die dazugehörigen Transkriptionsfaktoren, die die Proinsulingen-Transkription regulieren. AC, Adenylatzyklase; JAK, Janus Tyrosinkinase; PKA, Proteinkinase A; PI3-K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; MAPK, Mitogen aktivierte Proteinkinase; CaMK, Ca/Calmodulin-abhängige Proteinkinase; IRS, Insulinrezeptorsubstrat; PDE3B, Phosphodiesterase 3B; Nach Melloul et al. (18).

Glukose ist der prinzipielle Stimulator der Insulinbiosynthese und der Insulinsekretion. Eine erhöhte Glukosekonzentration führt sowohl zur Steigerung der Transkriptionsrate des Insulingens (19), als auch zum Anstieg der Halbwertszeit der Präproinsulin-mRNA und zur Steigerung der Translation der Präproinsulin-mRNA (19, 20). Die Schlüsselemente dieses Blutzuckersensors sind der GLUT2 (21) und eine  $\beta$ -Zell-spezifische Kinase, die

Km Kinase (22). Nachdem die Glukose durch den Glukosetransporter 2 (GLUT2) in die  $\beta$ -Zelle gelangt ist, wird sie durch Glykolyse verstoffwechselt. Das dabei entstehende ATP hemmt ATP-hemmbarere Kaliumkanäle. Durch den stark verminderten Kaliumausstrom kommt es zur Membrandepolarisation. Dies bewirkt eine Öffnung spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle. Der Einstrom der Kalziumionen in die  $\beta$ -Zelle ist der entscheidende Reiz für die Verschmelzung der insulinhaltigen Vesikel mit der Zellmembran. Dadurch kommt es zur Exozytose des Insulins und weiter zur Freisetzung in den Blutkreislauf. Die Speicher-Hexamere werden dabei aufgetrennt.

Hauptregulatoren, die die basale und Glukose-induzierte Insulingenexpression beeinflussen, sind PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox-1*) und Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) - Proteine. PDX-1 transloziert glukoseabhängig in den Zellkern und wird glukoseabhängig phosphoryliert, wodurch die DNA-Bindungsaffinität und damit das Transaktivierungspotential verstärkt werden. Umgekehrt bewirken anhaltend erhöhte Glukosespiegel eine Inhibition der Insulingenexpression sowie des PDX-1 Gens. Darüber hinaus reguliert PDX-1 die Expression einer Reihe von Genen, die für die  $\beta$ -Zell-Identität und Funktion unabdingbar sind (23).

Im Ratteninsulingenpromotor 1 bindet PDX-1 vor allem an das A3/A4-Element, das auch als Far-Region bezeichnet wird. Transkriptionsfaktoren aus der bHLH-Familie binden an das E2-Element, das auch Flat-Element genannt wird. Zusammen bilden die Elemente den Far-Flat-Minienhancer, worüber sie den Ratteninsulingenpromotor synergistisch aktivieren (24). Innerhalb des humanen Insulingenpromotors ist ein ähnlicher Mechanismus bis jetzt noch nicht bekannt. Es wurde dort allerdings zwischen -292 und -243 bp ein zusätzliches Glukose-responsives Element gefunden, welches mit einem bis jetzt nicht identifizierten  $\beta$ -Zell-spezifischen Komplex reagiert (25).

Die durch Glukose stimulierte Insulinsekretion führt zur Erhöhung der extrazellulären Insulinkonzentration, wodurch die Insulinsekretion und die Insulingenexpression der  $\beta$ -Zelle abnehmen (18, 26, 27). Die Bedeutung des Insulinrezeptors in insulinproduzierenden Zellen wurde gezeigt, indem diese

Rezeptoren bei Mäusen experimentell ausgeschaltet wurden. Als Reaktion auf Glukose nimmt die Insulinsekretion ab und die Glukosetoleranz der Mäuse verringert sich, was typisch für einen Diabetes mellitus Typ 2 ist (28). Insulin könnte aber auch an anderen  $\beta$ -Zell-spezifischen Genprodukten, wie z.B. GLUT2 oder der Glukokinase wirken und auf diesem Weg Schaden im Glukose-Signaltransduktionsweg mit daraus resultierender gestörter Glukose-Sensitivität hervorrufen (29).

Das Hormon Glucagon-like peptide- 1 (GLP-1), ein Peptidhormon aus neuroendokrinen Darmzellen, bindet an einen G-Protein assoziierten Rezeptor auf  $\beta$ -Zellen und stimuliert dadurch die durch Glukose induzierte Insulinsekretion, die Insulinbiosynthese und die Zellproliferation (30).

Das ob-Gen und dessen Genprodukt, das vom Fettgewebe gebildete Hormon Leptin und der zugehörige Rezeptor (OB-R) sind wichtige Faktoren bezüglich der Abstimmung des Gleichgewichts zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch. Durch Leptin wird die Nahrungsaufnahme gehemmt und der Energieverbrauch gesteigert.

Sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen führt der Mangel von Leptin zu Adipositas. Bei adipösen Menschen ist der Leptinserumspiegel oft erhöht, was darauf hindeutet, dass dieser Mechanismus nicht funktioniert. Dies lässt eher auf eine Leptinresistenz oder einen Postrezeptorendefekt schliessen als auf eine Mutation im Leptingen bzw. dessen Rezeptor, da diese Mutation sehr selten vorkommt (31). In  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas konnte gezeigt werden, dass Leptinrezeptoren exprimiert werden und dass Leptin sowohl die Proinsulingen-Expression als auch die Insulinsekretion hemmt (31). Umgekehrt stimuliert Insulin als adipogenes Hormon die Produktion von Leptin durch Adipozyten, so dass eine hormonelle Verbindung zwischen dem endokrinen Pankreas und dem Fettgewebe besteht. Diese Verbindung wird als „Adipoinsuläre Achse“ bezeichnet. Die Dysregulation dieser Achse mit daraus resultierender Leptinresistenz der  $\beta$ -Zellen führt zu einer chronischen Hyperinsulinämie, die wiederum zu gesteigerter Adipogenese und Insulinresistenz und somit zu einem weiteren Anstieg des Plasmaleptinspiegels führt. Auf diese Weise entsteht ein *circulus vitiosus* zwischen Fettgewebe und

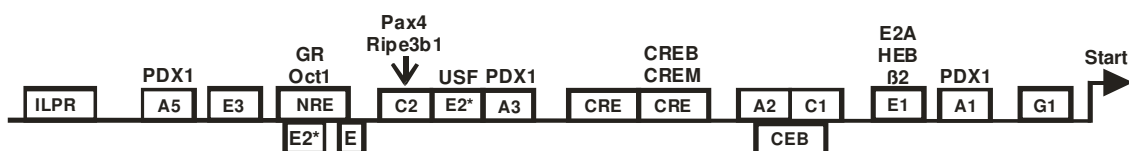
endokrinem Pankreas, der schließlich in eine  $\beta$ -Zelldysfunktion und somit in einen Diabetes mellitus Typ 2 mündet.

Wachstumshormon (GH), Prolactin (PRL) und Placentalaktogen (PL) regulieren primär die Proliferation pankreatischer  $\beta$ -Zellen, stimulieren aber auch die Insulinproduktion, z.T. durch Stimulation der Insulingen-Transkription (32, 33).

#### 1.4. Transkriptionelle Regulation der Insulingenexpression

Die Insulingen-Transkription wird durch eine komplexe Interaktion von unterschiedlichen, spezifischen DNA-Sequenzen des Insulinpromotors mit verschiedenen ubiquitären oder auch  $\beta$ -Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert. Deren Zusammenspiel bedingt die Regulation der Insulingenexpression als Antwort auf unterschiedliche physiologische Reize (18, 34). Als Promotor wird eine DNA-Sequenz bezeichnet, die die Expression eines Gens reguliert. Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist die spezifische Wechselwirkung mit bestimmten DNA-bindenden Proteinen, welche den Start der Transkription vermitteln und als Transkriptionsfaktoren (= trans-Elemente) bezeichnet werden. Ein cis-Element bezeichnet einen zu jeweils einem bestimmten Gen gehörenden Abschnitt. Durch das Vorhandensein dieser Abschnitte wird zusammen mit den dazugehörigen trans-Elementen die Transkription exakt reguliert.

Abbildung 1.2. zeigt einige cis-agierende regulatorische DNA-Elemente des humanen Insulingenpromotors mit den daran bindenden Transkriptionsfaktoren.



**Abb. 1.2.: Aufbau des humanen Insulingenpromotors.** Die cis-agierenden regulatorischen Elemente des humanen Insulingenpromotors sind in Kästchen dargestellt. Über den entsprechenden Elementen befinden sich die daran bindenden Transkriptionsfaktoren. E2\*, E-like element; GR, Glukokortikoid-Rezeptor; NRE, negatives regulatorisches Element. Modifiziert nach Melloul et al. (18).

Eine große Zahl von Transkriptionsfaktoren und Interaktionen, die bei der Regulation der Insulingenexpression eine Rolle spielen, sind bekannt. Im Folgenden sind einige der regulatorischen Elemente sowie deren Bindungspartner und Interaktionen beschrieben.

Unter den aktivierenden cis-agierenden regulatorischen Elementen scheinen vor allem die E- und A-Elemente für die  $\beta$ -Zell-spezifische Expression des Insulins verantwortlich zu sein.

Die beiden E-Elemente (E1 und E2) enthalten eine identische Sequenz mit der Basenfolge CANNTG. Sie binden Proteine der bHLH-Familie, wie z.B. E12/E47, HEB und den Komplex *insulin enhancer factor-1* (IEF-1) (18, 34). Der humane Insulingenpromotor und der Ratteninsulingenpromotor 2 enthalten im Gegensatz zum Ratteninsulingenpromotor 1 kein E2-Element, sondern eine verwandte Sequenz, das sogenannte E2-like-element (E2\*), das das HLH-Protein USF (*upstream stimulating factor*) bindet (35).

Bei den A-Elementen (A1, A2, A3 und A5) handelt es sich um AT-reiche Sequenzen, die, bis auf A2, im humanen Insulingenpromotor die Kernsequenz TAAT enthalten. Diese Elemente binden Proteine der Homeo-Box Familie, wie z.B. PDX-1, einer der Hauptaktivatoren der Insulingenexpression und gleichzeitig zentraler Regulator der Pankreasentwicklung (18, 34).

In  $\beta$ -Zellen wird intrazelluläres cAMP (*cyclic AMP*) durch Glukose und verschiedene Hormone, wie z.B. Glukagon oder GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*), erhöht (36). cAMP reguliert die Transkription von Genen, die CREs (*cyclic AMP response element*) besitzen, indem es den Transkriptionsfaktor CREB (*CRE binding protein*) bindet. Im humanen Proinsulingen wurden vier CREs gefunden, zwei davon im Bereich des Promotors.

Das C2-Element ist im humanen Insulingenpromotor zwischen -253 und -244 bp lokalisiert und enthält drei CAGG-Wiederholungen (37). Das C2-Element bindet PAX (*paired box gene*) 6 und PAX4. PAX6 agiert als Aktivator, PAX4 dagegen als Repressor der Insulingenexpression. Beide spielen zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Pankreasentwicklung (38).

5' von -360 bp des humanen Insulingenpromotors sind die so genannten ILPRs (*Insulin-linked polymorphic region*) lokalisiert. Diese Regionen werden auch als

VNTRs (*variable number of tandem repeats*) oder HVRs (*hypervariable region*) bezeichnet und bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen der Basensequenz ACAGGGGT(G/C)(T/C)GGGG. Sie werden nach der Anzahl der Wiederholungen in drei Hauptgruppen eingeteilt, dabei sollen die Allele der Klasse 1 für Diabetes mellitus Typ 1 prädisponieren (39) und die der Klasse 3 für den Diabetes mellitus Typ 2 (40).

Zur Hemmung der Insulingenexpression wurde im humanen Insulingenpromotor ein negatives regulatorisches Element (NRE) zwischen -280 und -260 bp gefunden. Weiter wurde gezeigt, dass dieses Element überlappende putative Sequenzen enthält, die verschiedene nukleäre Proteine binden, wie z.B. den Glukokortikoidrezeptor (41) und den ubiquitär vorkommenden Faktor Oct-1 (42).

### **1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Bisher wurde die Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors nur in speziesdifferenten  $\beta$ -Zelllinien, d.h. in insulinproduzierenden Zellen von Ratte oder Maus untersucht, da glukosesensitive humane  $\beta$ -Zelllinien nicht verfügbar sind. Es existieren also noch keine Daten über die Regulation des humanen Insulingenpromotors in primären  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen. Die Daten über die Regulation des humanen Insulingenpromotors in speziesdifferenten Zelllinien können jedoch nicht problemlos auf die Regulation des Insulingenpromotors in primären humanen Zellen übertragen werden, da identische Promotoren in Zellen unterschiedlicher Spezies different reguliert werden können. Primäre  $\beta$ -Zellen aus dem endokrinen Pankreas des Menschen sind nur in geringer Anzahl verfügbar und lassen sich *in vitro* nicht vermehren, ausserdem zeigt die nonvirale Transfektion von primären  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen nur eine geringe Effizienz. Deshalb werden Vektoren benötigt, mit deren Hilfe sich hochsensitiv die Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen bestimmen lässt.

Das Ziel dieser Arbeit ist also die direkte Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen aus Spenderpankreaata.

Diese Arbeit stellt einen Beitrag zur detaillierten Untersuchung der gestörten funktionellen Insulinsekretion beim Diabetes mellitus Typ 2 dar und spielt somit auf lange Sicht eine Rolle bei der Entwicklung neuer Möglichkeiten in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien und weitere Reagenzien

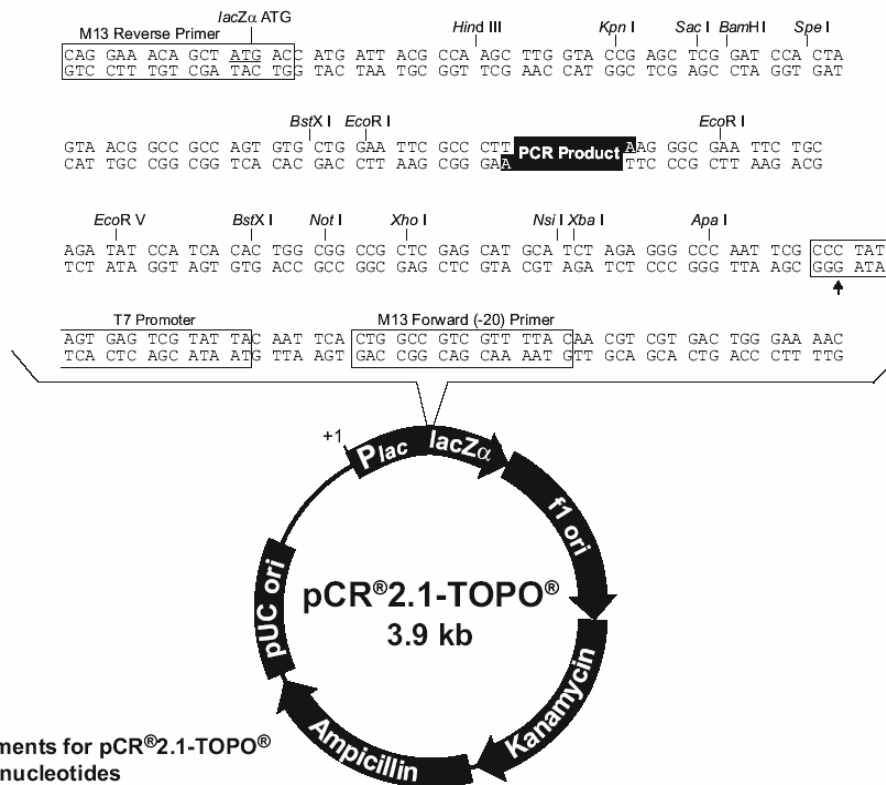
Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham	Buckinghamshire, UK
Becton Dickinson	Heidelberg, BRD
Gibco™ Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, BRD
J.T. Backer	Deventer, Holland
Merck	Darmstadt, BRD
Pharmacia Up John	Erlangen, BRD
Roth	Karlsruhe, BRD
Sigma	St. Louis, USA



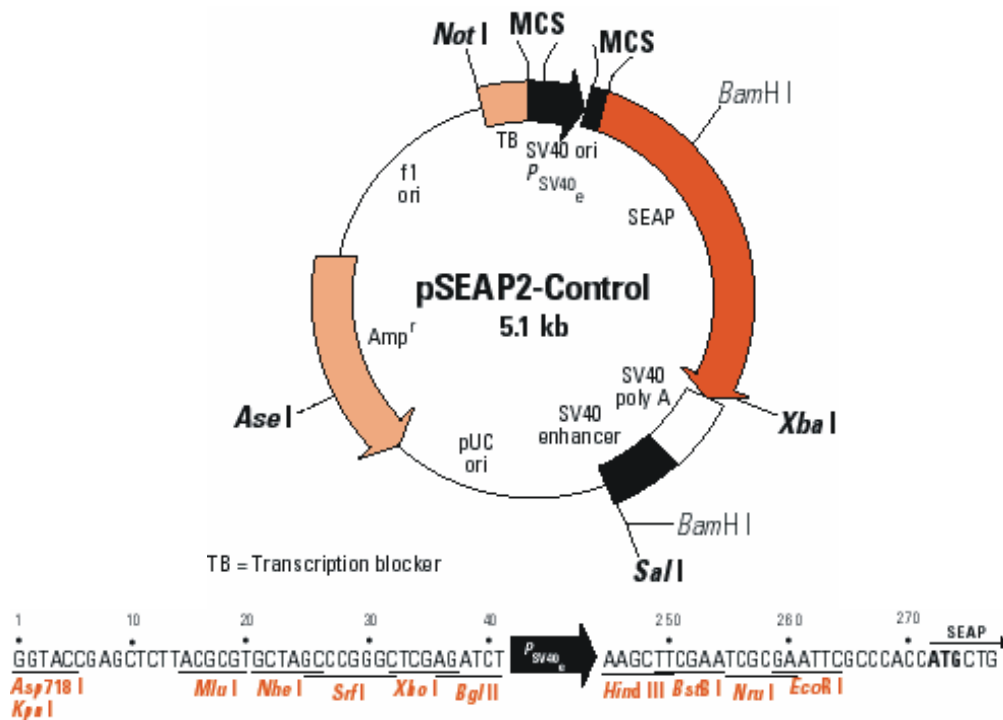
## 2.2. Plasmide

- pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (3.9 kb) (Invitrogen, LifeTechnologies, Karlsruhe, BRD)  
Dieser Vektor wurde für die Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TOPO<sup>™</sup>TA-Cloning verwendet und mit dem Kit geliefert. Die *Multiple Cloning Site* ist im LacZ $\alpha$  Fragment enthalten. Selektion über Kanamycinresistenz (Kan<sup>r</sup>) und Ampicillinresistenz (Amp<sup>r</sup>).



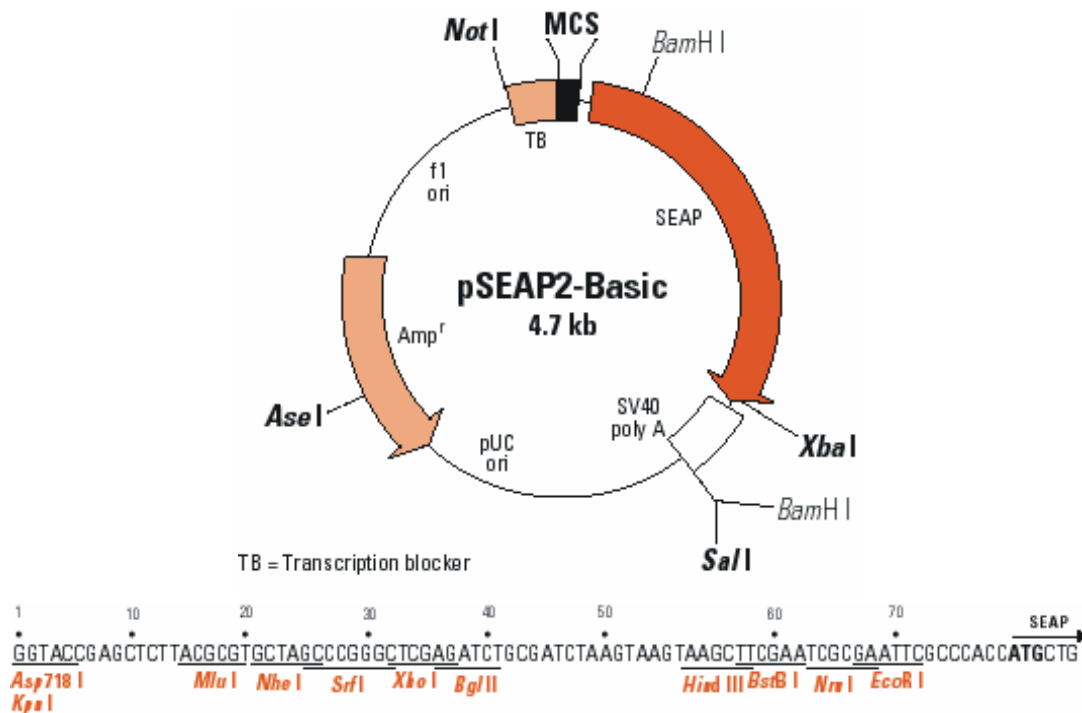
**Abb. 2.1.:** pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. Dieser Vektor wurde für die Klonierung von PCR-Fragmenten verwendet

- pSEAP2-Control (5.1 kb) (Becton-Dickinson, Heidelberg, BRD)  
Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle eines SV40-Promotors, der konstitutiv aktiviert ist. Daher erfolgte seine Verwendung als Positivkontrolle. Amp<sup>r</sup>.



**Abb. 2.2.: pSEAP2-Control.** Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle des konstitutiv aktivierten SV40-Promotors.

- pSEAP2-Basic (4.7 kb) (Becton-Dickinson, Heidelberg, BRD)  
Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*). Er wurde zur Klonierung sämtlicher Vektoren, die in SEAP-Reporter-Gen-Versuchen eingesetzt wurden verwendet. Amp<sup>r</sup>.



**Abb. 2.3.: pSEAP2-Basic.** Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)

- p-336hInsP-SEAP (5.15 kb). Dieser Vektor wurde im Verlauf der Arbeit kloniert. Er enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle des -336 bp langen humanen Insulinpromotors. Amp<sup>r</sup>. Siehe Methodenteil, 3.13.
- p-311hInsP-SEAP, p-293hInsP-SEAP, p-268hInsP-SEAP, p-254hInsP-SEAP, p-201hInsP-SEAP, p-173hInsP-SEAP, p-130hInsP-SEAP sind Deletionskonstrukte des Plasmids p-336hInsP-SEAP. Amp<sup>r</sup>. Siehe Methodenteil, 3.14.

### 2.3. Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden Puffern wurden von den Firmen NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, BRD) und Promega (Mannheim, BRD) bezogen. Spezielle Enzyme sind unten aufgeführt.

- Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) (Promega, Mannheim, Germany)
- High Fidelity Taq™-Polymerase (Promega, Mannheim, BRD)
- T4-Ligase (Promega, Mannheim, BRD)

### 2.4. Oligonukleotid-Primer

Folgende Primer zur Herstellung der p-336hInsP-SEAP-Deletionskonstrukte wurden von IBA, Göttingen, BRD bezogen:

- hINSp-B:  
5' - GCA TGG TGG GCG AAT TCG CG - 3'
- hINSp-1:  
5' - GGA AAG TGG CCC AGG TGA GGG C - 3'
- hINSp-2:  
5' - GGG CTT TGC TCT CCT GGA G - 3'
- hINSp-3:  
5' - GCC CCC AGC TGT GAG CAG GG - 3'
- hINSp-4:  
5' - GCA GGG ACA GGT CTG GCC ACC G - 3'
- hINSp-5:  
5' - GTC CTG AGG AAG AGG TGC TG - 3'
- hINSp-6:  
5' - GGA GAT CTT CCC ACA GAC CCA GC - 3'
- hINSp-7:  
5' - ATT GCA GCC TCA GCC CCC AGC - 3'

Folgende Primer für die Sequenzierung wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD bezogen:

- M13\_Rev:  
5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
- M13\_For:  
5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'
- pSEAP – MCSup:  
5' – CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC - 3'
- pSEAP – MCSdown:  
5' – CCT CGG CTG CCT CGC GGT TCC - 3'

## 2.5 Transfektionsreagenzien

- ExGen500<sup>®</sup> (Fermentas International, Ontario, Kanada)
- Fugene<sup>®</sup> (F. Hoffmann-LaRoche Ltd., Indianapolis, USA)
- Metafectene<sup>®</sup> (Biontex Laboratories GmbH, München, BRD)
- Superfect<sup>®</sup>, Effectene<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, BRD)
- Lipofectamine<sup>®</sup> (Invitrogen, LifeTechnologies, Karlsruhe, BRD)

## 2.6. Zelllinien

- INS-1- $\beta$ -Zellen: Insulin produzierende Ratteninsulinom-Zellen als Modell für  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas (erhalten von C.B. Wollheim, Abteilung Klinische Biochemie und experimentelle Diabetologie, Universität Genf, Schweiz)
- Beta-TC3-Zellen: Insulin produzierende Mausinsulinom-Zellen als Modell für  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas
- Humane Inselzellen: Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen (erhalten von M.D. Brendel, R.G. Bretzel, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Universitätsklinikum Giessen, BRD)

## 2.7. Zellkulturmedien

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

- INS-1- $\beta$ -Zellen/humane Inselzellen: RPMI 1640 (ohne Glutamin, mit 11,1 bzw. 5,6 mM Glukose), 10% hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS), 1% L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), 1% Natrium Pyruvat (1 mM), 1% HEPES (10 mM), 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM) 11,2 mM Glukose entspricht der Standard-Glukosekonzentration, bei 5,6 mM Glukose handelt es sich um ein Niedrigglukosemedium.
- Beta-TC3-Zellen: DMEM (mit Glutamin, mit 25 bzw. 5,6 mM Glukose), 10% hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), 1% L-Glutamin (2 mM) 25 mM Glukose entspricht der Standard-Glukosekonzentration, bei 5,6 mM Glukose handelt es sich um ein Niedrigglukosemedium.
- Einfriermedium: Kulturmedium mit zusätzlich 10% FBS und 5% DMSO.
- TX-Medium (Transfektionsmedium): jeweiliges Zellkulturmedium (s.o.) ohne Antibiotikum und ohne FBS

## 2.8. Reagenziensätze (Kits)

- Gel-Extraktion: QIAquick-Gel-Extraction-Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, BRD)
- Mini-DNA-Präparation: FastPlasmid Mini<sup>®</sup> (Eppendorf, Engelsdorf, BRD)
- Mini-Monster-DNA-Präparation: Rapid-Pure-Mini-Monsterprep<sup>®</sup> (RPM<sup>®</sup> 4G) (Invitrogen, LifeTechnologies, Karlsruhe, BRD):
- Chemilumineszenz SEAP-Assay: Great EscAPe<sup>™</sup> SEAP (Becton-Dickinson, Heidelberg, BRD)
- Sequenzierung: AutoSeq<sup>™</sup> G-50<sup>®</sup> (PE Applied Biosystems/ABI PRISM, Forster City, USA)
- TOPO-Cloning: TOPO<sup>™</sup>TA Cloning Kit (Invitrogen, LifeTechnologies, Karlsruhe, BRD)

## 2.9. Bakterien

- JM109<sup>®</sup>, DH5 $\alpha$ <sup>®</sup> (Stratagene, Kirkland, USA)
- TOP10<sup>®</sup> (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, BRD)

## 2.10. Bakterienmedien

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone<sup>®</sup>, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract<sup>®</sup>, 10 g/l NaCl. Nach dem Autoklavieren und nach Abkühlung auf eine Temperatur < 50 °C wurde ein Antibiotikum zugegeben (50 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin).
- LB-Medium-Platten: Zum LB-Medium (mit Antibiotikum) wurde 20 g/l Agarose gegeben und in Petrischalen gegossen.
- SOC-Medium: Dieses Medium wurde nach der Transfektion als Nährmedium benutzt. 20 g/l Bacto-Tryptone<sup>®</sup>, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract<sup>®</sup>, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose
- SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Tryptone<sup>®</sup>, 5 g/l Bacto-Yeast-Extract<sup>®</sup>, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

## 2.11. Puffer:

- TAE (Tris-acetat-EDTA): 40 mM Trisacetat, 1 mM EDTA, pH 8,3
- PBS (phosphate-buffered-saline): 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- TB-Puffer (Transformations-Puffer) : 10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7-7,0

### 2.12. Elektrophorese von DNA

- 100 bp DNA-Marker (0,1 µg/µl), Fragmentgrößen 100-2072 bp (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- 1 kbp DNA-Marker (0,1 µg/µl), Fragmentgrößen 201-12216 bp (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- DNA-Loading-Puffer: 30 % Glycerol, 0,1 mM EDTA, 1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylene-Cyanol

### 2.13. Geräteliste, Verbrauchsmaterialien und Software

- Becton-Dickinson, Heidelberg, BRD: Falcon-Tubes 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen 50 und 250 ml, 6-Well- und 12-Well-Zellkulturplatten, 10 cm Zellkulturschalen
- Beckmann, Osterode, BRD: Ultrazentrifuge L7-55, Zentrifuge CH ANJ25
- Bio-Rad-System, Hercules, USA: Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer, E. coli-Pulser, Elektroporationskammer
- Brand, Wertheim, BRD: Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl
- Carl-Zeiss, Göttingen, BRD: Fluoreszenzmikroskop Axioskop20
- DNASTAR, Madison, USA: Lasergene<sup>®</sup> Software
- EG & G Berthold, Bad Wildbad, BRD: MicroLumat LB 96P
- Eppendorf, Engelsdorf, BRD: Heizblock, Photometer, Thermomixer, Pipetten, Uvetten
- Greiner, Longwood, USA: Cryo-Vials 1,8 ml, Reagiergefäße 50 ml
- Hartenstein, Würzburg, BRD: Magnetrührer, pH-Meter, Absaugpumpe, PCR-Gefäße 0,2 ml, Zellschaber 24 mm, Reagenzreservoir in V-Form, Wecker
- Heraeus, Osterode, BRD: Brutschrank, Laminar-Flow-Hood, Biofuge 28 RS
- Hettich, Tuttlingen, BRD: Zentrifuge ROTANDA/RFC
- Melag, Berlin, BRD: Autoklav



- Perkin-Elmer, Shelton, USA: Sequenzer ABI310, Thermocycler (Gen-Amp-PCR-System 9700)
- Sarstedt, Nümbrecht, BRD: Reagiergefäße 1,5 ml, Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml und 20 ml, Petrischalen für Bakterien
- Starlab GMBH, Ahrensberg, BRD: Filterpipettenspitzen 0,1-10 µl, 1-100 µl und 101-1000 µl

### 3. Methoden

#### 3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) kann ein spezifischer DNA-Abschnitt zwischen zwei sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern (sense und antisense Primer) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase amplifiziert werden.

Zur Denaturierung der DNA wird der PCR-Ansatz zunächst für 2 min auf 94 °C erhitzt. Die weitere Reaktion besteht aus drei Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Diesen Ablauf bezeichnet man als Zyklus. Im ersten Schritt des Zyklus erfolgt die Denaturierung der DNA-Matrize, beim zweiten Schritt (Annealing) binden die Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA-Matrize und dienen damit im dritten Schritt (Elongation) der DNA-Polymerase als Startmolekül. Dieser Zyklus wird 30x wiederholt, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen DNA-Fragments kommt.

Nach Abschluss der Temperaturzyklen wird der Reaktionsansatz zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen nochmals für 2 min auf 72 °C erhitzt. Die Inkubationsschritte der PCR werden in einem programmierbaren Heizblock (Thermalcycler) durchgeführt.

Schritte einer PCR:

	Vorgang	Temp.	Zeitdauer
Initiale	Denaturierung	94 °C	2 min
30x	Denaturierung	94 °C	0,5-1 min, je nach Fragmentlänge
	Annealing	50-64 °C	0,5-1 min, je nach Fragmentlänge
	Elongation	72 °C	30 sec pro 500 bp
Finale	Elongation	72 °C	2 min

Soweit nicht anders beschrieben, wurde der folgende PCR-Ansatz mit 50  $\mu$ l Gesamtvolumen gewählt:

- 5  $\mu$ l 10x Puffer
- 5  $\mu$ l dNTP (2,5 mM of each)
- 1  $\mu$ l „sense-Primer“ (0,5  $\mu$ mol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l „antisense-Primer“ (0,5  $\mu$ mol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l Polymerase (5U/ $\mu$ l)
- DNA-Template (100 ng)
- Aqua dest. (ad 50  $\mu$ l)

### **3.2. TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese**

Mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese kann DNA ihrer Größe nach aufgetrennt werden, da hochmolekulare DNA-Stücke aufgrund ihrer höheren Molekularmasse langsamer durch ein Gel von der Kathode zur Anode wandern als niedermolekulare.

Je nach Fragmentgröße wurden 0,8 – 2,0 %ige TAE-Agarose-Gele verwendet, wobei zur Auftrennung niedermolekularer Fragmente Gele mit höherer Agarosekonzentration benötigt wurden, zur Trennung hochmolekularer Fragmente niedriger konzentrierte.

Tankpuffer war TEA, die angelegte Spannung betrug 100 V. Die DNA wurde mit DNA-Loading-Puffer versetzt und konnte nach Lagerung in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch Zugabe eines DNA-Markers war es möglich, einzelne Banden einer bestimmten DNA-Länge zuzuordnen.

### 3.3. Konzentrationsmessung von Nukleinsäureproben

Protein-, RNA- und DNA- Konzentrationen in wässriger Lösung können durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 (Proteine) und 280 (RNA, DNA) nm berechnet werden. Als Referenz- bzw. Leerwert diene H<sub>2</sub>O bzw. das jeweilige Lösungsmittel. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  wird als *Ratio* bezeichnet und erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäureprobe. Für DNA sollte die Ratio zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Bei Verunreinigungen durch Protein oder organische Lösungsmittel ist die *Ratio* erniedrigt.

Über die Messung der  $OD_{260}$  kann die Konzentration der Nukleinsäure in der Probe berechnet werden. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 µg/ml und bei einzelsträngigen Oligonukleotiden 20 µg/ml.

### 3.4. Methoden zum Klonieren eines Plasmids

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

#### 3.4.1. Enzymatische Reaktionen

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsenzyme an spezifischen Stellen geschnitten werden, da Restriktionsenzyme bestimmte Basensequenzen erkennen und schneiden. Die geschnittene DNA kann glatt (*blunt*) oder mit einem kurzen einzelsträngigen DNA-Abschnitt (*sticky*) enden (Überhang). Insert und Vektor können nur ligiert werden, wenn die zu verknüpfenden Stellen mit dem selben Enzym geschnitten sind. Ist dies nicht möglich, so müssen nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen die DNA-Überhänge des Plasmids oder

des Inserts durch eine Klenow- oder T4-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt werden.

### **3.4.2. Verdau von Insert und Vektor mit Restriktionsenzymen**

Zunächst wurde das Insert durch Verdau mit Restriktionsenzymen aus einem Plasmid herausgeschnitten. Hierzu wurden zwei das Insert flankierende Schnittstellen verwendet. Befand sich in 5'- und in 3'-Richtung des Inserts je eine Schnittstelle für dasselbe Enzym, und wurde das Insert mit nur einem Enzym herausgeschnitten, so spricht man von einem Single-Digest. Auch das Plasmid, in das das Insert ligiert werden sollte, wurde mit Restriktionsenzymen aufgeschnitten. Insert und Vektor konnten nur ligiert werden, wenn die zu verknüpfenden Stellen von demselben Enzym geschnitten worden waren. War dies nicht möglich, so wurden nach Verdau mit Restriktionsenzymen die DNA-Überhänge des Vektors und des Inserts mit Hilfe von Klenow-Polymerase (vgl. 3.4.2.) aufgefüllt und Insert und Vektor ligiert.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde ein Standard-Restriktionsverdau mit 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt und drei Stunden bei 37 °C inkubiert:

- DNA (1-5µg)
- 2 µl BSA (*bovine serum albumin*, 1 mg/ml)
- 2 µl enzyspezifischer 10x Puffer
- 1 µl Enzym (10U/µl)
- Aqua dest. (ad 20 µl)

### **3.4.3. Auffüllen von Überhängen mit Klenow-Polymerase**

Um die 3'- und 5'- Überhänge der verdauten DNA mit Nukleotiden aufzufüllen wurde ein 50 µl Ansatz gewählt:

- DNA (1-4 µg)
- 5 µl 10x Klenow Puffer
- 5 µl 10 mM dNTP-Mix (2,5 mM of each)
- 2 µl Klenow Polymerase (5 U/l)
- Aqua dest. (ad 50 µl)

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

#### **3.4.4. Dephosphorylieren mit alkalischer Phosphatase**

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase werden die Phosphatgruppen am Ende eines mit Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmids abgespalten. Die Plasmide wurden immer dann dephosphoryliert, wenn sie mit nur einem Enzym verdaut wurden (*single-digest*) und ein Insert zwischen die Schnittstellen ligiert werden sollte. Die Dephosphorylierung verhindert die Religation des Vektors (*backbone*), die ansonsten gegenüber dem Einbau des Inserts statistisch dominant wäre.

Es wurde ein 100 µl Ansatz gewählt:

- 20 µl verdautes Plasmid (20-25 µg)
- 10 µl 10x CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*)-Puffer
- 2 µl CIAP (1 U/ µl)
- Aqua dest. (ad 100 µl)

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert und 15 Minuten bei 56°C denaturiert. 37°C ist das Temperaturoptimum für das Enzym, bei 56°C wird es inaktiviert. Nach Zugabe von nochmals 2 µl alkalischer Phosphatase wurden die beiden Reaktionsschritte ein zweites Mal durchgeführt um sicherzugehen, dass die Reaktion vollständig ablief.

### 3.4.5. Ligation von Insert und Vektor

Insert und Vektor wurden durch das Enzym T4-Ligase ligiert. Der Erfolg einer Ligation wird durch das molare Verhältnis der Insert- und Vektormoleküle bestimmt. Daher wurden mehrere Ansätze erstellt, die bei gleicher Menge Vektor unterschiedliche Konzentrationen des Inserts enthielten. Zur Bestimmung dieser Verhältnisse wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} \cdot \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}}$$

In einem weiteren Ansatz war kein Insert vorhanden (Religationskontrolle).

Es wurde ein 10 µl Ansatz gewählt:

- 1 µl Vektor (100 ng)
- 1 µl T4-Ligase (3U/ µl)
- 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer
- x µl Insert (x ng, abhängig von o.g. Formel)
- Aqua dest. (ad 10 µl)

### 2.4.6. Ligation mit dem TOPO™TA Cloning Kit

Die direkte Klonierung der durch die HF (*high fidelity*)-DNA-Polymerase generierten PCR-Fragmente in Plasmidvektoren erfolgte mit dem TOPO™TA Cloning Kit. Das durch die HF-Polymerase entstandene Insert kann aufgrund seiner entstandenen A-Überhänge gut mit dem in dem Kit enthaltenen linearisierten Vektor (pCR®2.1-TOPO) ligiert werden, da der Vektor am 3'-Ende einen Deoxythymidinrest (T) besitzt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Topoisomerase I katalysiert, das an den pCR®2.1-TOPO-Vektor kovalent gebunden ist.

Entsprechend der Anleitung wurden 1 µl Vektor-DNA (pCR®2.1-TOPO) und 0.5-4 µl PCR-Produkt mit H<sub>2</sub>O auf 5 µl Gesamtvolumen gebracht und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandene Plasmid-DNA konnte direkt in der

Hitzeschocktransformation eingesetzt werden. Hierfür wurden die mit dem Kit gelieferten kompetenten Bakterien (TOP10 One Shot™ cells) verwendet.

#### **3.5. Extraktion von DNA aus einem Gel**

Schneidet man mittels Restriktionsenzymen ein Plasmid um ein Insert zu generieren, kann man beide Fragmente (Insert, Backbone) mittels Gelelektrophorese trennen. Anschließend wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die in den Gelstücken enthaltene DNA wurde mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit® laut Herstellerprotokoll isoliert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **3.6. Herstellung ultrakompetenter Bakterien für den DNA-Transfer mittels Hitzeschocktransformation**

Sind Bakterien in der Lage, Plasmid-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und zu vermehren, bezeichnet man sie als kompetent. Escherichia coli der Stämme DH5 $\alpha$  und JM109 wurden gemäß dem Protokoll von Inoue (43) ultrakompetent gemacht. Dabei wurden 250 ml SOB-Medium mit einer JM109 bzw. DH5 $\alpha$  Übernachtskultur beimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 in einem Rotationsschüttler inkubiert (ca. 3-4 Stunden). Nach Erreichen der gewünschten  $\text{OD}_{600}$  wurde die Kultur 10 Minuten auf Eis abgekühlt und danach 10 Minuten bei  $2500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (Transformations-Puffer, vgl. 2.11) resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei  $2500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und unter leichtem Schwenken wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% (1,4 ml) zugegeben, 10 Minuten auf Eis inkubiert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.



### **3.7. Transformation durch Hitzeschock**

Zu 100 µl der ultrakompetenten E. coli wurden 10 µl des Ligationsansatzes gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach exakt 90 Sekunden auf 42°C erhitzt. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden 200 µl SOC-Medium (vgl. 2.10) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

### **3.8. Ausplattieren der Bakterien und Picken von Klonen**

Nachdem die transformierten Bakterien ca. eine Stunde im SOC-Medium gewachsen waren, wurden mit etwa 120 µl der Bakteriensuspension antibiotikahaltige LB-Nährmedienplatten (vgl. 2.10) beimpft. Durch Selektion über die Resistenz gegen ein Antibiotikum waren nach 24 Stunden bei 37°C auf den LB-Platten Bakterienkolonien gewachsen, jedoch nicht auf der Platte der Bakterien, die mit der Religationskontrolle (kein Insert) transformiert worden war. Mehrere 15 ml- Reagiergefäße mit 4 ml antibiotikahaltigem LB-Medium wurden mit je einer der gepickten Kolonien beimpft, so dass sich in jedem Reaktionsgefäß nur Bakterien eines Klons befanden. Nachdem sich die Bakterien während Inkubation bei 37°C im Schüttler über Nacht vermehrt hatten, konnten mittels Mini-DNA-Präparation (vgl. 3.10.) die Plasmide aus den Bakterien isoliert werden.

### **3.9. Glyceroldauerkulturen**

Zur Aufbewahrung von transformierte Bakterien über einen längeren Zeitraum wurde ein Glycerolstock erstellt. Dafür wurden in LB-Medium befindliche Bakterien mit Einfriermedium zu je gleichen Teilen vermischt. Das Einfriermedium bestand aus 65 % Glycerol, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,625 mM TrisCl.

800 µl einer frischen Bakterienübernachtskultur und 800 µl Einfriermedium wurden vorsichtig gemischt und in Reaktionsgefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.10. Mini-DNA-Präparation**

Um die in Bakterien vermehrte Plasmid-DNA zu isolieren, wurde eine Mini-DNA-Präparation durchgeführt. Hierfür wurde der FastPlasmid Mini<sup>®</sup>-Kit gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

### **3.11. Mini-Monster-DNA-Präparation**

Wie bei der Mini-DNA-Präparation wurden bei der Mini-Monster-DNA-Präparation Plasmide aus Bakterien isoliert. Während mit der Mini-DNA-Präparation Plasmide aus Bakterien, die in 4 ml LB-Medium gewachsen waren isoliert wurden, wurde dies bei der Mini-Monster-DNA-Präparation mit Bakterien aus 1 l LB-Medium durchgeführt.

### **3.12. DNA-Sequenzierung**

#### **3.12.1. Sequenzierungs-PCR**

Für die Sequenzierungs-PCR werden neben den normalen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch 3'-fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Diese verursachen nach ihrem Einbau einen Strangabbruch. Die vier verwendeten ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die jeweils unterschiedliche Exzitations- und Emissionsspektren besitzen. Durch die Sequenzierungs-PCR entsteht so eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die zwar alle das


gleiche 5'-Ende, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit alle möglichen 3'-Enden besitzen. Es liegen also so viele unterschiedliche Fragmente vor, dass, geordnet nach ihrer Größe, nach dem kleinsten jedes nächstgrößere jeweils nur ein Nukleotid länger, nämlich das bei der Synthese eingearbeitete ddNTP ist.

Es wurde folgender PCR-Ansatz gewählt:

- 3 µl Big-Dye-Mix (s.u.)
- 1 µl Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 – 1 µg DNA
- Aqua dest. (ad 20 µl)

Im Big-Dye-Mix waren dNTPs, ddNTPs, Puffer und Polymerase und MgCl<sub>2</sub> enthalten.

Bedingungen der Sequenzierungs-PCR:

	Vorgang	Temp.	Zeitdauer
Initiale	Denaturierung	94 °C	5 min
25x	 Denaturierung Annealing Elongation	96 °C	30 sec
		50 °C	15 sec
		60 °C	5 min
		4 °C	ohne Zeitbegrenzung

### 3.12.2. Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung

Nach der PCR wurden die Proben mit Natrium-Acetat gefällt. Das Pellet wurde in 17 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Davon wurden 8 µl und zusätzlich 12 µl Hi-Di™- (*highly deionized*) Formamide in spezielle 0,5 ml Sequenzierröhrchen überführt. Vor Beginn der Sequenzierung wurden die Proben für 2 Minuten bei 94 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

### 3.12.3. Sequenzierung

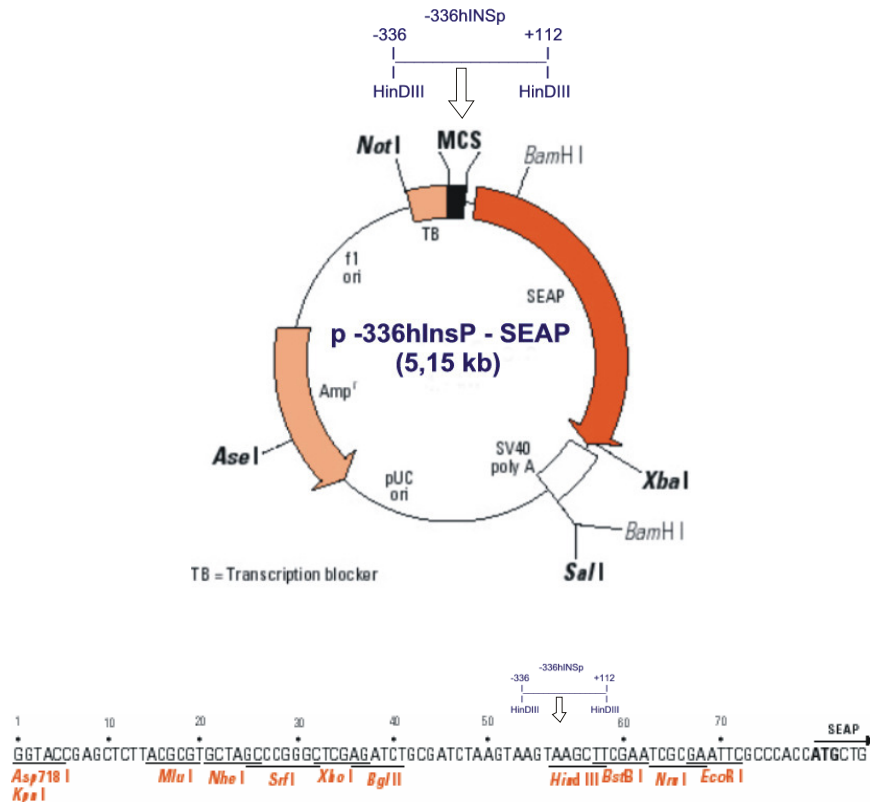
Sequenziert wurde mit dem automatischen Sequenzierer ABI PRISM<sup>®</sup> 310. Im Sequenzierer werden die Fragmente einer Probe mittels Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt. Das sich am Ende eines Stranges befindende fluoreszierende Nukleotid wurde beim Durchtritt durch eine Kapillare mit Laser bestrahlt und konnte anhand seiner charakteristischen Fluoreszenz der entsprechenden Base zugeordnet werden. Mit dieser Methode können 200-400 bp lange DNA-Abschnitte sequenziert werden. Mit dem Programm Lasergene<sup>®</sup> der Firma DNASTAR wurde die Auswertung der Sequenzen durchgeführt.

### 3.13. Klonieren des Plasmids p-336hInsP-SEAP

Ein 336 bp (-336 bis +112 bp) langes Fragment des humanen Insulinpromotors (aus p-336hINSpGI3) wurde in die HindIII-Restriktionsstelle des promotorlosen Vektors pSEAP2-Basic kloniert. Das resultierende Plasmid exprimiert SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle des humanen Insulinpromotorfragments. Hierdurch lassen sich Aufschlüsse über den Grad der Aktivität des Insulinpromotors in INS-1, beta-TC3-Zellen bzw. humanen Inselzellen erhalten.

Diese Länge des Fragments wurde gewählt, weil mit Deletionskonstrukten zwischen -1373 bis +1 bp bereits gezeigt werden konnte, dass die größte Abnahme der Insulinpromotoraktivität durch das Fehlen der Sequenzen zwischen -341 bis -260 bp und -233 bis -171 bp hervorgerufen wird (44).

Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Fragmentanalyse durch Restriktionsverdau und Elektrophorese überprüft. Für den Restriktionsverdau wurde BglII als Enzym verwendet. Das gewünschte Fragment hatte eine Länge von 190 bp.



**Abb. 3.1.:** Karte von p-336hInsP-SEAP: Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) unter der Kontrolle des -336 bp langen humanen Insulinpromotorfragments.

### 3.14. Klonieren der 5'-Deletionskonstrukte des humanen Insulingenpromotors

Im -336 bp langen humanen Insulingenpromotor sind verschiedene transkriptionell responsive Elemente für z.B. die Transkriptionsfaktoren PDX-1, CREB und BETA2 bekannt. Diese spielen für die Aktivierung des Promotors eine wichtige Rolle. Um dies genauer untersuchen zu können, wurden 5'-Deletionskonstrukte des Vektors p-336hInsP-SEAP konstruiert, bei denen die bekannten Bindungsstellen systematisch am 5'-Ende deletiert wurden (Abb. 3.2.-3.5.).

Die zugehörigen "sense"-Primer (hINSp 1-7, vgl. 2.4.) wurden anhand der Basensequenz des Vektors p-336hInsP-SEAP und der bekannten responsiven

Elemente für die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren entwickelt. Als "antisense"-Primer wurde hINSp-B (vgl. 2.4.) verwendet.

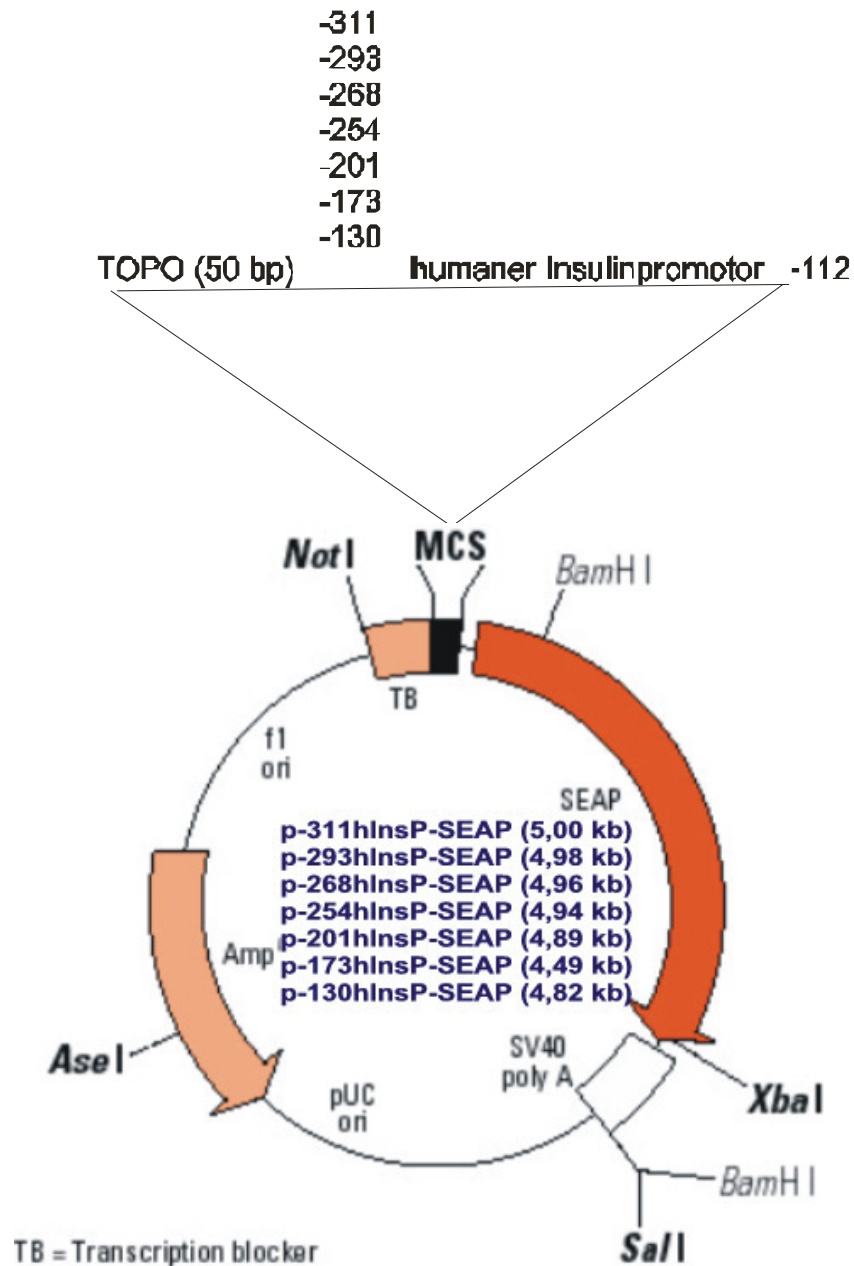
Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde zuerst eine PCR mit der High-Fidelity Taq-DNA-Polymerase durchgeführt (vgl. 3.1.), wobei die Annealing Temperatur bei 55°C lag und die Zyklen 36x wiederholt wurden. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, extrahiert und in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor subkloniert. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Einbaurichtung mittels Sequenzierung.

Waren die PCR-Produkte in gewünschter Richtung in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor eingebaut, wurden die Fragmente mit den Restriktasen KpnI und XhoI geschnitten und in den Vektor pSEAP2-Basic subkloniert.

Um die Wiederholung der Startsequenz ATG für das SEAP-Reportergen zu eliminieren, mussten diese Konstrukte nochmals mit HindIII aufgeschnitten werden. Dann erfolgte die Auftragung auf 2%-iges Agarosegel und die Extraktion des gewünschten etwa 4500 bp großen Fragments. Danach konnten die auf diese Weise entstandenen Produkte wieder religiert werden.

Waren die PCR-Produkte in entgegengesetzter Richtung in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor integriert, wurde das gewünschte Fragment mit HindIII und XhoI in den Vektor pSEAP2-Basic subkloniert.

Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Sequenzierung überprüft.



**Abb. 3.2.:** Karte der Plasmide p-311hInsP-SEAP, p-293hInsP-SEAP, p-268hInsP-SEAP, p-254hInsP-SEAP, p-201hInsP-SEAP, p-173hInsP-SEAP, p-130hInsP-SEAP. Sie enthalten das -311, -293, -268, -254, -201, -173 bzw. -130 bp lange Fragment des humanen Insulinpromotors.

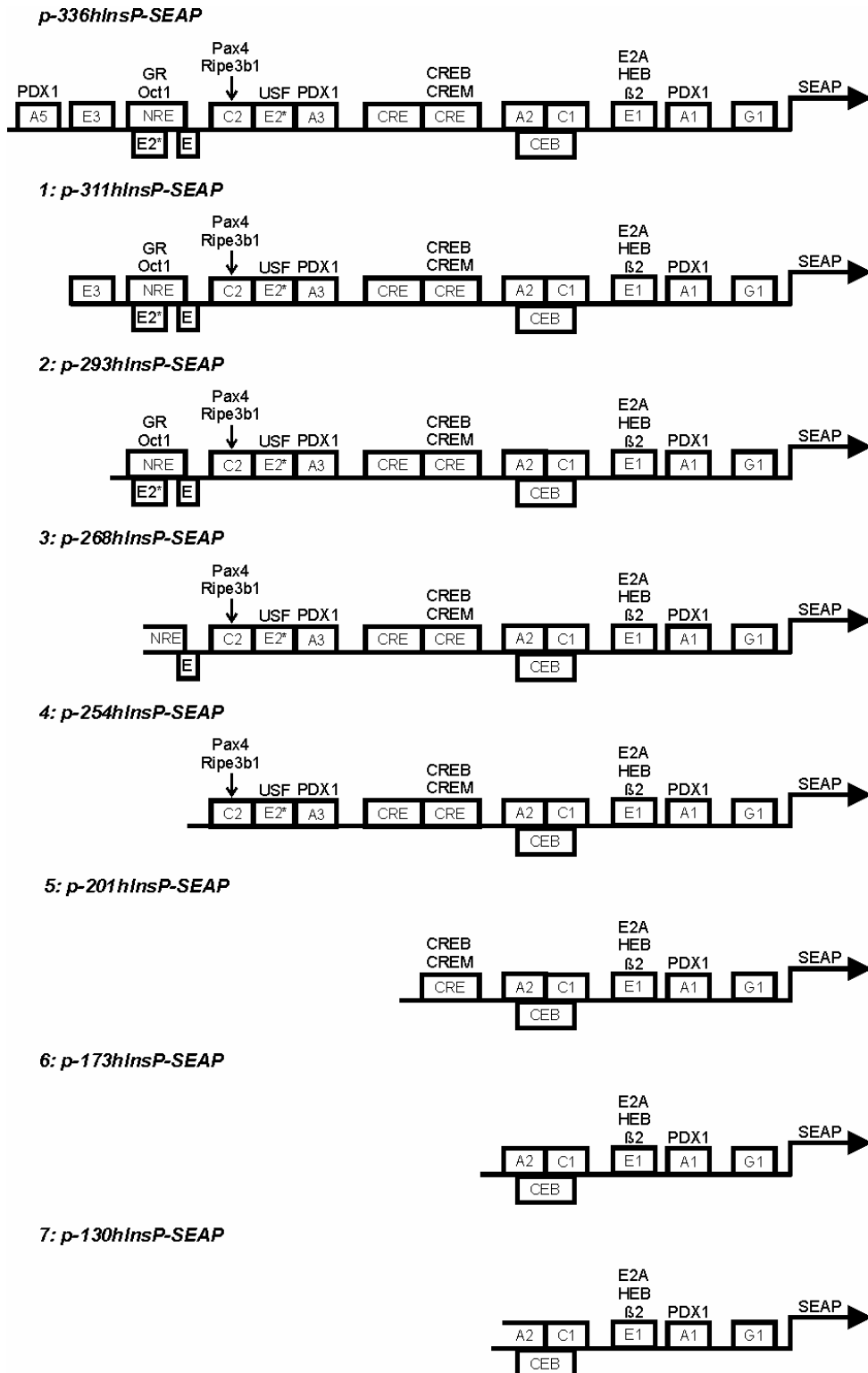


Abb. 3.3.: Schematische Darstellung der verschiedenen DNA-Bindungselemente und ihrer spezifisch bindenden Transkriptionsfaktoren in den untersuchten Deletionskonstrukten des humanen Insulingenpromotors. Zu den Abkürzungen siehe Abb. 1.2. (modifiziert nach 18 und 45).



$\xrightarrow{\text{pSEAP2-Basic}}$   
 5' – CTA GCA AAA TAG GCT GTC CCC AGT GCA AGT GCA GGT GCC AGA ACA TTT CTC  
 $\xrightarrow{\text{pCR}^{\text{®}}2.1\text{-TOPO}^{\text{®}}}$   
 TAT CGA TAC GAG CTC GGA TCC ACT AGT AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA ATT CGC  
 $\xrightarrow{\text{pSEAP2-basic}}$   
 CCT T humaner Insulinpromotor AG CTT CGA ATC GCG AAT TCG CCC ACC ATG CTG  
  
 CTG CTG CTG CTG CTG CTG GGC CTG AGG CTA CAG CTC TCC CTG GGC ATC ATC CCA  
  
 GTT GAG GAG GAG AAC CCG GAC TTC TGG AAC CGC GAG GCA GCC GAG G – 3'

**Abb. 3.4.: Sequenz der Konstrukte 1-6.** Darstellung der bei der Klonierung entstanden Sequenz der Deletionskonstrukte 1-6 aus Abb. 3.3.

$\xrightarrow{\text{pSEAP2 Basic}}$   
 5' – CTA GCA AAA TAG GCT GTC CCC AGT GCA AGT GCA GGT GCC AGA ACA TTT CTC  
 $\xrightarrow{\text{pCR}^{\text{®}}2.1\text{-TOPO}^{\text{®}}}$   
 TAT CGA TAG CGG CCG CCA GTG TGA TGG ATA TCT GCA GAA TTC GCC CTT  
 $\xrightarrow{\text{pSEAP2-Basic}}$   
humaner Insulinpromotor AGC TTC GAA TCG CGA ATT CGC CCA CCA TGC TGC  
  
 TGC TGC TGC TGC TGC TGG GCC TGA GGC TAC AGC TCT CCC TGG GCA TCA TCC  
  
 CAG TTG AGG AGG AGA ACC CGG ACT TCT GGA ACC GCG AGG CAG CCG AGG – 3'

**Abb. 3.5.: Sequenz des Konstrukts 7.** Darstellung der bei der Klonierung entstanden Sequenz des Deletionskonstrukts 7 aus Abb. 3.3.

### 3.15. Durchführung des SEAP-Assays

#### 3.15.1. Vorbereitung der Proben

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl vom Überstand von transfizierten Zellen entnommen und in einer Tischzentrifuge eine Minute bei 12 000 rpm zentrifugiert. Um möglichst keine Zellen mehr im Medium zu haben wurden aus dieser Probe 90 µl Überstand abpipettiert und in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### 3.15.2. Durchführung des Assays

Entsprechend der Anleitung des Great EscAPe™ SEAP-Detection-Kit wurden jeweils 15 µl der Probe auf 96-Well-Platten mit 45 µl 1x Dilution Buffer gemischt und für 30 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach zwei- bis dreiminütiger Abkühlung auf Eis wurden 100 µl Assay-Buffer zugegeben und nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 100 µl 1,25 mM Chemilumineszenz-CSPD-Substrat. CSPD ist das Substrat der alkalischen Phosphatase, das eine Detektion von SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) mit einer unteren Nachweisgrenze von 100 fg ermöglicht.

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Chemilumineszenz-Messung im Luminometer.

### 3.16. Zellkultur

Als Zelllinien wurden INS-1-β-Zellen (Ratteninsulinom) und beta-TC3-Zellen (Mausinsulinom), beides Modelle für β-Zellen, und β-Zellen aus humanen Pankreasinseln verwendet. Die Zellkulturmedien sind in Abschnitt 2.7. beschrieben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02% in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) wurden sie von

den Zellkulturplatten abgelöst, bei 1200 rpm abzentrifugiert und im Verhältnis 1:4 gesplittet und ausgesät.

### **3.16.1. Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer**

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Konzentration von Zellen in einer Lösung bestimmt werden. Die Kammer enthält Quadrate, deren Volumen jeweils  $0,1 \text{ mm}^3$  beträgt. Durch Auszählen mehrerer dieser Quadrate, Bildung des arithmetischen Mittels und Multiplizieren mit 10 000 wurde die Zellmenge pro ml bestimmt. Die zu zählenden adhärenen Zellen wurden von den Zellkulturschalen trypsiniert, zentrifugiert, in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und ausgezählt.

### **3.16.2. Transfektion von INS-1- $\beta$ - und beta-TC3-Zellen mit Metafectene<sup>®</sup>**

Mit Metafectene<sup>®</sup> wurden transiente Transfektionen von INS-1 und beta-TC3-Zellen durchgeführt. Es wurden  $4 \times 10^5$  Zellen auf 6er- Wells in 1ml Medium ausgesät. Für die Transfektion wurden 1  $\mu\text{g}$  DNA und 2  $\mu\text{l}$  Metafectene<sup>®</sup> in 50  $\mu\text{l}$  RPMI<sup>®</sup> 1640 für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Komplexbildung) und der Transfektionsansatz auf die am Vortag ausgesäten Zellen gegeben. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstand wurden 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden nach Transfektion entnommen und darin mittels SEAP-Assay der Gehalt an SEAP bestimmt.

### 3.16.3. Transfektion von humanen Inselzellen mit Metafectene<sup>®</sup>, Fugene<sup>®</sup>, ExGen500<sup>®</sup>, Superfect<sup>®</sup> oder Effectene<sup>®</sup>

Mit Metafectene<sup>®</sup>, Fugene<sup>®</sup>, ExGen500<sup>®</sup>, Superfect<sup>®</sup> oder Effectene<sup>®</sup> wurden transiente Transfektionen von humanen Inselzellen durchgeführt. Es wurden 140 000 Zellen auf 6er- Wells ausgesät und sofort nach Aussaat transfiziert. Dazu wurden DNA-Menge, Reagenz, Enhancer und Inkubationszeit in 50 µl RPMI<sup>®</sup> 1640 (Komplexbildung) entsprechend unten folgender Tabelle variiert. Jeweils 100 µl Überstand wurden 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden nach Transfektion entnommen und darin mittels SEAP-Assay der Gehalt an SEAP bestimmt.

Reagenz	µg DNA	µl Reagenz	µl Enhancer	min Inkubation
Metafectene <sup>®</sup>	2	10		30
Fugene <sup>®</sup>	2/2	6/12		15-20
ExGen500 <sup>®</sup>	1/2	5,5/11		10
Superfect <sup>®</sup>	2	10		10
Lipofectamine <sup>®</sup>	1	8		15
Effectene <sup>®</sup>	0,4/0,4/0,4	4/10/20	3,2/3,2/3,2	5-10

### 3.17. Statistik

Statistische Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurden mit ANOVA- und Post hoc- oder T-Test berechnet. Zur Berechnung wurde das Programm Prism 3 (GraphPad) verwendet.

Unterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet wenn  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*).

## 4. Ergebnisse

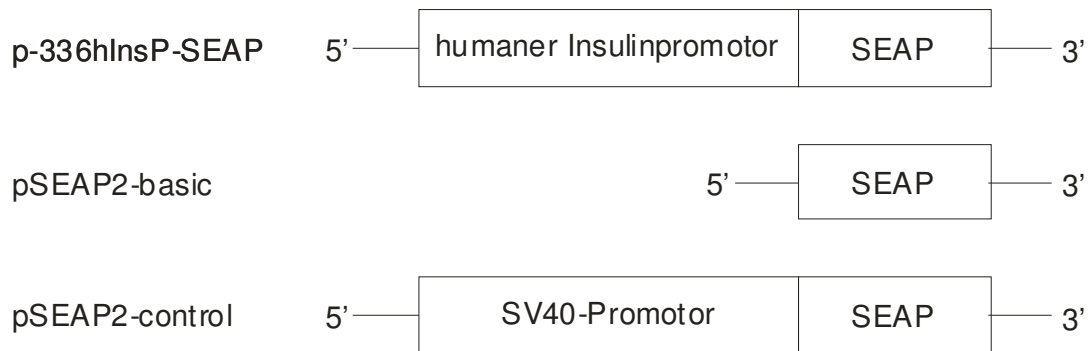
### 4.1. Etablierung eines Systems zur hochsensitiven Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors

Um die Aktivität des humanen Insulingenpromotors sowohl in tierischen Zelllinien als auch in Zellen aus humanen Spenderpankreatata untersuchen zu können, wird ein System benötigt, mit dessen Hilfe sich hochsensitiv die Insulingenpromotoraktivität bestimmen lässt.

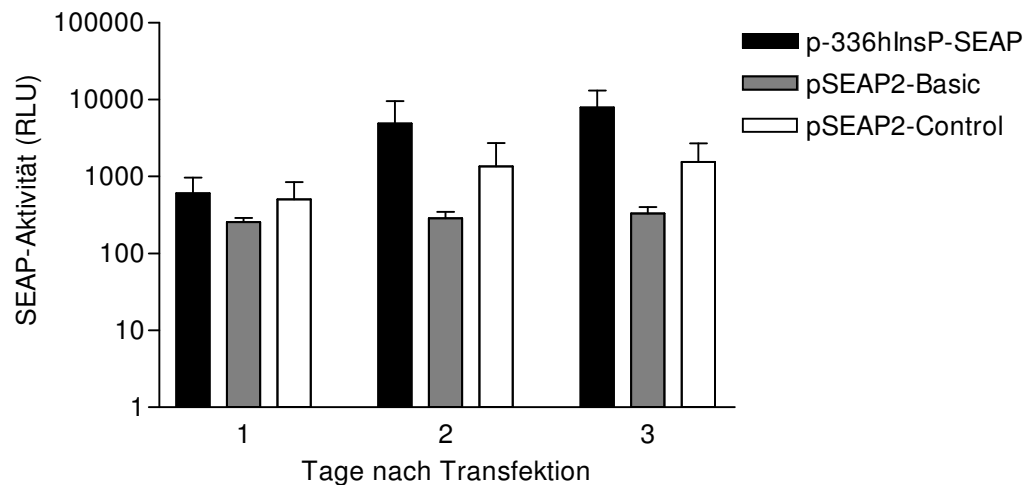
Hochsensitiv muss dieses System sein, da primäre  $\beta$ -Zellen aus dem endokrinen Pankreas des Menschen nur in geringer Anzahl verfügbar sind und sich *in vitro* nicht vermehren lassen. Zusätzlich erreicht man durch nonvirale Transfektion von primären  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen nur eine geringe Effizienz.

Um das SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-Reporter-System zu testen, wurden INS-1- $\beta$ -Zellen transient mit den Vektoren p-336hInsP-SEAP, pSEAP2-Basic (ohne Promotor, also Negativkontrolle) und pSEAP2-Control (mit Promotor, also Positivkontrolle) transfiziert (siehe Abb. 4.1.). 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurde mittels des BD Great EscAPe™ SEAP-Chemilumineszenz-Reporter-System Assay luminometrisch die SEAP-Aktivität im Überstand der 6-Well-Zellkulturschalen als Maß für die Aktivität des humanen Insulingenpromotors bestimmt. Das SEAP-System eignet sich gut für diese Untersuchungen, da SEAP im Medium akkumuliert und keine Lyse der Zellen notwendig ist. Ein weiterer Vorteil ist die ungefähr 10-100-fach höhere Sensitivität des SEAP-Chemilumineszenz-Assays im Vergleich zu einem Luciferase-Assay.

A.



B.



**Abb. 4.1.:** A. Vektoren zur hochsensitiven Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors. Schematische Darstellung von p-336hInsP-SEAP, pSEAP2-Basic (Negativkontrolle) und pSEAP2-Control (Positivkontrolle). B. Aktivität des humanen Insulingen-Promotors in INS-1- $\beta$ -Zellen. Transiente liposomale Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit pSEAP2-Basic als Negativkontrolle, pSEAP2-Control als Positivkontrolle und p-336hInsP-SEAP (jeweils 0,5  $\mu$ g DNA) zur Bestimmung der Aktivität des humanen Insulingenpromotors. Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). SEAP, *secreted alkaline phosphatase*; RLU, *relative light units*.

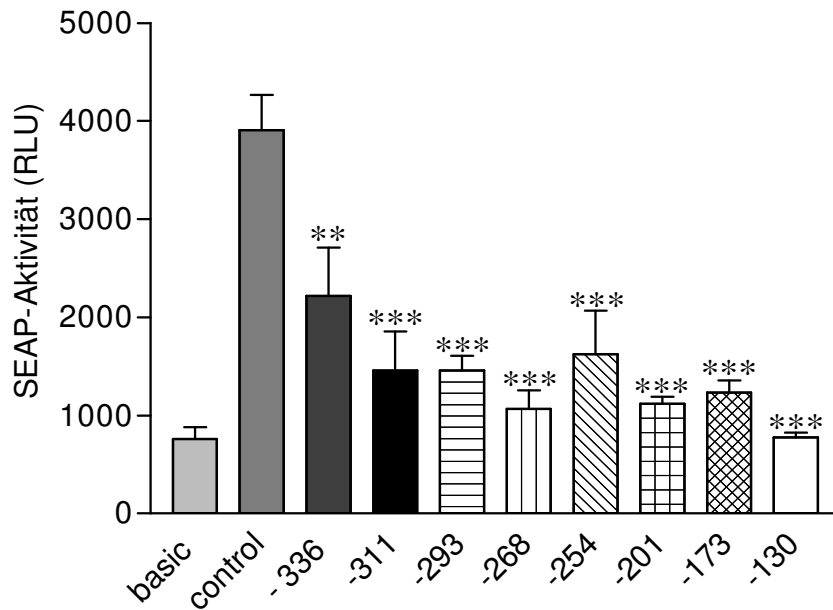
Wie in Abb. 4.1.B. erkennbar, zeigt der Vektor p-336hInsP-SEAP in INS-1- $\beta$ -Zellen sogar stärkere Aktivität als der Vektor pSEAP2-Control. Im Verlauf der drei Tage nach Transfektion liegt die Aktivität des Vektors p-336hInsP-SEAP um das 1,2- bis 5,1-fache über der des Vektors pSEAP2-Control. Die Ergebnisse dieses Pilotexperiments belegen die prinzipielle Eignung des SEAP-Reporter-Gen-Systems für die geplanten Experimente.

## 4.2. Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit Deletionskonstrukten

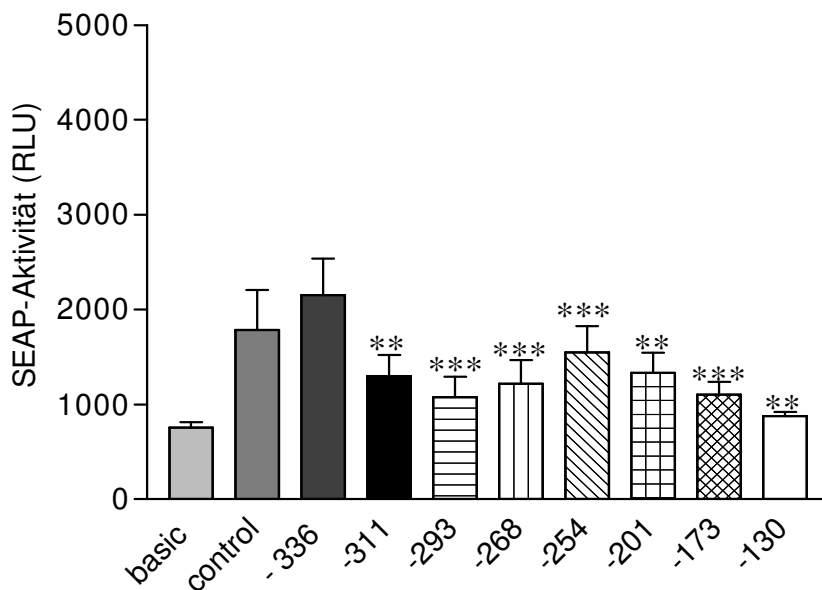
Im -336 bp langen humanen Insulingenpromotor sind verschiedene transkriptionell responsive Elemente für z.B. die Transkriptionsfaktoren PDX-1, CREB und BETA2 bekannt. Diese spielen für die Aktivierung des Promotors eine wichtige Rolle. Um deren Funktion genauer untersuchen zu können, wurden 5'-Deletionskonstrukte des Vektors p-336hInsP-SEAP konstruiert (Abb. 3.3.), bei denen bekannte Bindungsstellen systematisch am 5'-Ende deletiert wurden (Konstruktion vgl. 3.14.).

Mit diesen Deletionskonstrukten erfolgte die Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen, deren Zellkulturmedium 5,6 mM (Abb. 4.2.A.) oder 11,2 mM (Abb.4.2.B.) Glukose enthielt. INS-1- $\beta$ -Zellen sind Insulin-produzierende Ratteninsulinom-Zellen (vgl. 2.6.).

A.



B.



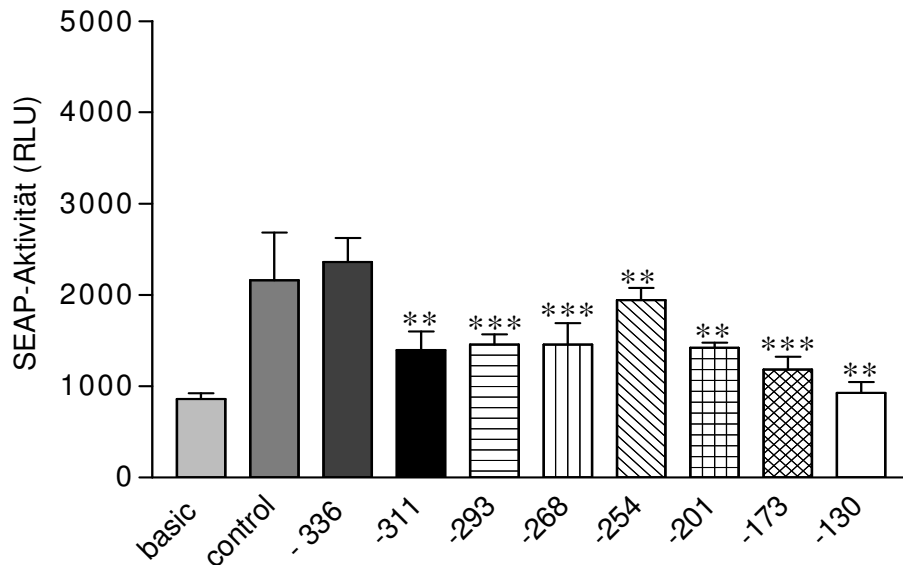
**Abb. 4.2.:** Transiente liposomale Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit den SEAP-Reportergenkonstrukten pSEAP2-Basic (Negativkontrolle), pSEAP2-Control (Positivkontrolle), p-336hInsP-SEAP (-336) und 5'-Deletionskonstrukten des humanen Insulingenpromotors (-311 bis -130). Gemessen wurde die Glukose-induzierte Aktivierung der Insulinpromotorfragmente (jeweils 1,0  $\mu$ g DNA). Probeentnahme 48 h nach Transfektion.

A. Bei 5,6 mM Glukose, B. Bei 11,2 mM Glukose. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Mittel aus drei Experimenten als Duplikat, relativ zur Aktivität der Negativkontrolle. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.



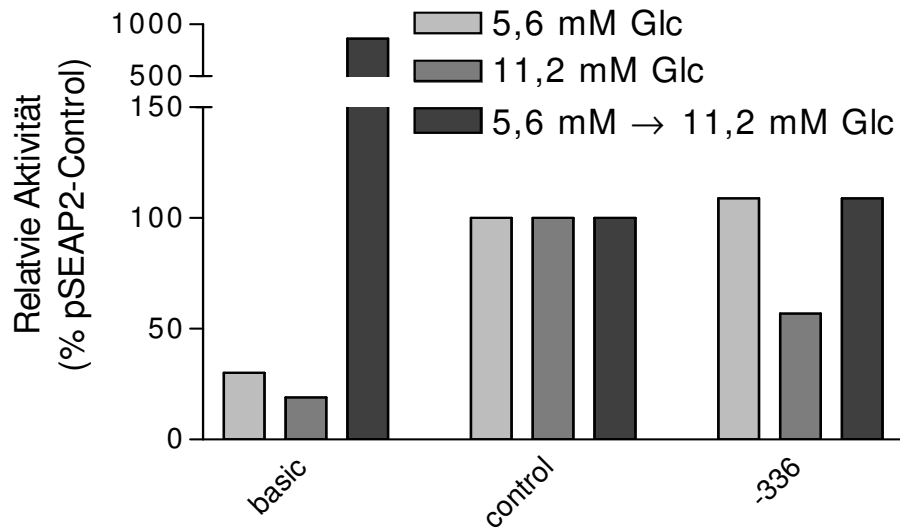
Wie in den beiden Abbildungen zu sehen ist, steigt die transkriptionelle Aktivität des humanen Insulingenpromotors in INS-1- $\beta$ -Zellen erwartungsgemäß leicht an, wenn die Glukosekonzentration von 5,6 mM (Niedrigglukosemedium) auf 11,2 mM (Standardmedium) erhöht wird. Sowohl bei 5,6 als auch bei 11,2, mM Glukose findet sich keine stark ausgeprägte Änderung in der transkriptionellen Aktivität des humanen Insulingenpromotors zwischen dem längsten (-311) und dem kürzesten (-130) Deletionskonstrukt, die Glukose-induzierte Aktivierung ist also von der Länge der Fragmente zwischen -311 bis -130 bp praktisch unbeeinflusst. Die stärkste Abnahme der Aktivität des humanen Insulingenpromotors findet sich zwischen den kompletten (p-336hInsP-SEAP) Insulingenpromotor und zwischen dem ersten Deletionskonstrukt (p-311hInsP-SEAP).

Um diese Aussage über die Glukoseresponsivität des humanen Insulingenpromotors bestätigen zu können wurde folgendes Experiment durchgeführt: INS-1- $\beta$ -Zellen wurden mehrere Passagen vor Transfektion in Zellkulturmedium mit 5,6 mM Glukosekonzentration inkubiert. Sofort nach Transfektion der Zellen wurde die Glukosekonzentration auf 11,2 mM erhöht (Abb. 4.3.).



**Abb. 4.3.:** Transiente liposomale Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit den SEAP-Reportergenkonstrukten pSEAP2-Basic (Negativkontrolle), pSEAP2-Control (Positivkontrolle), p-336hInsP-SEAP (-336) und 5'-Deletionskonstrukten des humanen Insulingenpromotors (-311 bis -130). Gemessen wurde die Glukose-induzierte Aktivierung der Insulinpromotorfragmente (jeweils 1,0  $\mu$ g DNA). Das Zellkulturmedium enthält bis zur Transfektion 5,6 mM Glukose (Niedrigglukosekonzentration), nach Transfektion Stimulation mit 11,2 mM Glukose (Standardglukose). Probeentnahme 48 h nach Transfektion. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Mittel aus drei Experimenten als Duplikat, relativ zur Aktivität der Negativkontrolle. \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Als Zusammenschau der vorangegangenen Abbildungen (Abb. 4.2. und Abb. 4.3.) läßt sich anhand Abb. 4.4. nochmals deutlich die Glukose-induzierbare Promotoraktivität des humanen Insulingenpromotors nachweisen.



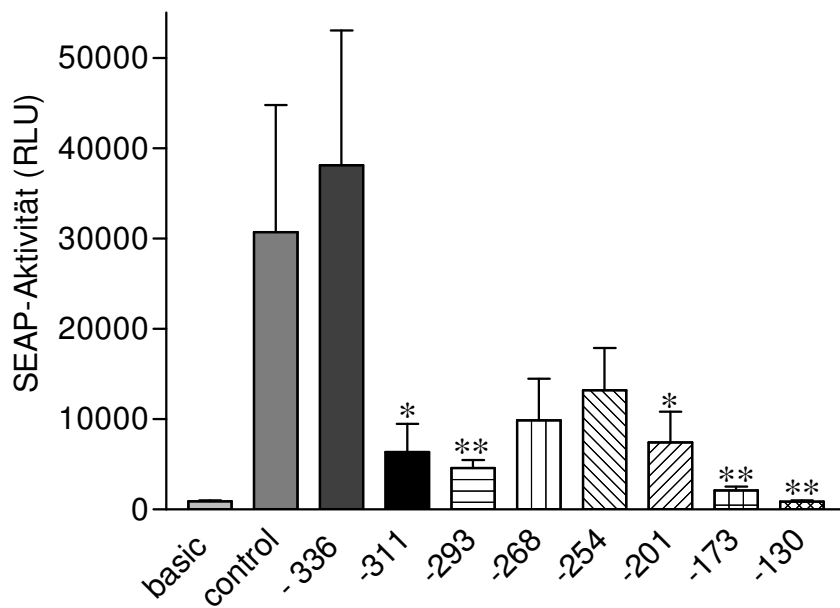
**Abb. 4.4.:** Transiente liposomale Transfektion von INS-1- $\beta$ -Zellen mit den SEAP-Reportergenkonstrukten pSEAP2-Basic (Negativkontrolle), pSEAP2-Control (Positivkontrolle), p-336hInsP-SEAP (-336). Das Zellkulturmedium enthält 5,6 mM (Niedrigglukosemedium), 11,2 mM Glukose (Standardmedium) bzw. bis Transfektion 5,6 mM und nach Transfektion Stimulation mit 11,2 mM Glukose. Probeentnahme 48 h nach Transfektion. Gemessen wurde die Glukose-induzierte Aktivierung der Insulinpromotorfragmente (jeweils 1,0  $\mu$ g DNA). Die Aktivität von pSEAP2-Control wurde in der jeweiligen Glukosekonzentration als 100% gesetzt. Glc, Glukose. SEAP, *secreted alkaline phosphatase*. RLU; *relative light units*.

### **4.3. Transfektion von beta-TC3-Zellen mit Deletionskonstrukten**

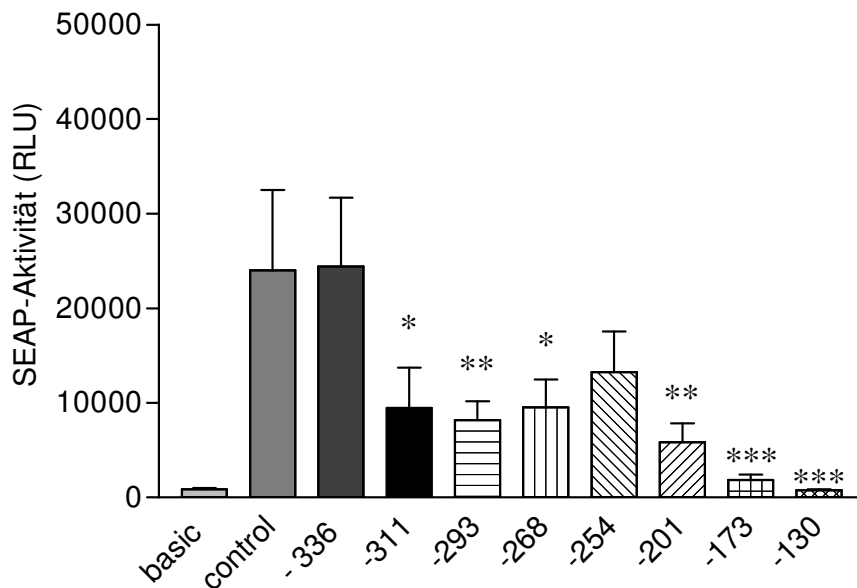
Um die bis jetzt dargestellten Ergebnisse nochmals überprüfen zu können, erfolgte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Transfektion von beta-TC3-Zellen, die in Zellkulturmedium mit 5,6 mM Glukosekonzentration (Niedrigglukose) oder 25 mM (Standardglukose) gehalten wurden mit den in Abb. 3.3. dargestellten Deletionskonstrukten und den Vektoren p-336hInsP-SEAP, pSEAP2-Basic und pSEAP2-Control. Bei beta-TC3-Zellen handelt es sich um Insulin-produzierende Mausinsulinom-Zellen (vgl. 2.6.).

Bei einer Glukosekonzentration von 5,6 mM im Zellkulturmedium der beta-TC3-Zellen (Abb. 4.5.) zeigt sich ein tendenziell ähnlicher Verlauf wie bei den in INS-1- $\beta$ -Zellen durchgeführten Versuchen (Abb. 4.2.).

A.



B.



**Abb. 4.5.:** Transiente liposomale Transfektion von beta-TC3-Zellen mit den SEAP-Reportergenkonstrukten pSEAP2-Basic (Negativkontrolle), pSEAP2-Control (Positivkontrolle), p-336hInsP-SEAP (-336) und 5'-Deletionskonstrukten des humanen Insulingenpromotors (-311 bis -130). Gemessen wurde die Glukose-induzierte Aktivierung der Insulinpromotorfragmente (jeweils 1,0 µg DNA). Probeentnahme 48 h nach Transfektion.

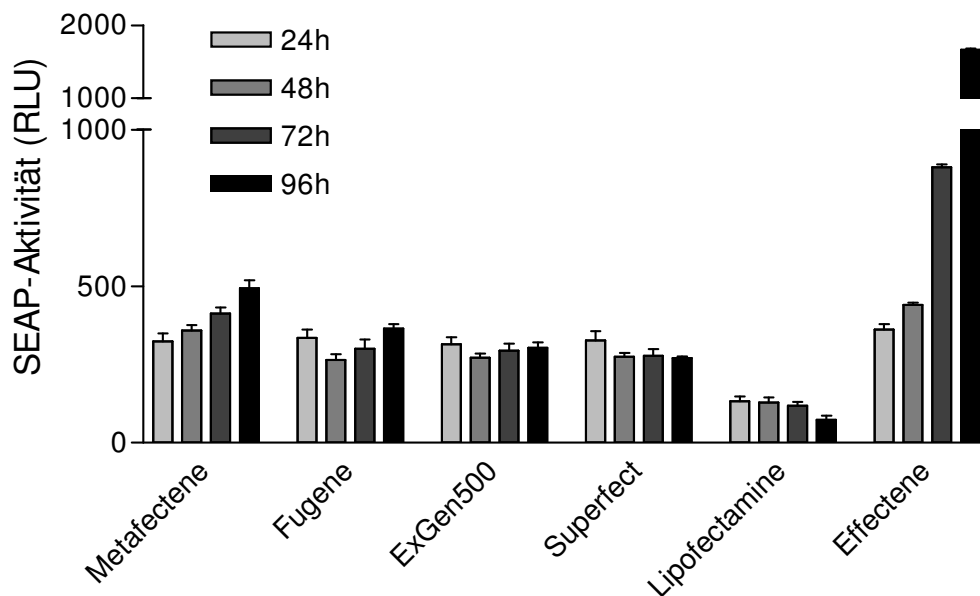
A. Bei 5,6 mM Glukose, B. Bei 25 mM Glukose. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Mittel aus drei Experimenten als Duplikat, relativ zur Aktivität der Negativkontrolle. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Wie bei INS-1- $\beta$ -Zellen (Abb. 4.2.) lässt sich in Abb.4.5.A. und 4.5.B. erkennen, dass die transkriptionelle Aktivität des humanen Insulingenpromotors auch in beta-TC3-Zellen erwartungsgemäß ansteigt, wenn die Glukosekonzentration von 5,6 mM (Niedrigglukose) auf 25 mM (Standardglukose) erhöht wird. In beta-TC3-Zellen findet sich eine stärker ausgeprägte Abnahme der transkriptionellen Aktivität des humanen Insulingenpromotors zwischen dem längsten (-311) und dem kürzesten (-130) Deletionskonstrukt.

Durch die Transfektionen von INS-1- $\beta$ -Zellen und beta-TC3-Zellen bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen wird hier die Glukoseresponsivität des humanen Insulingenpromotors in Zellen unterschiedlicher Spezies bewiesen.

#### 4.4. Transfektion von primären humanen $\beta$ -Zellen

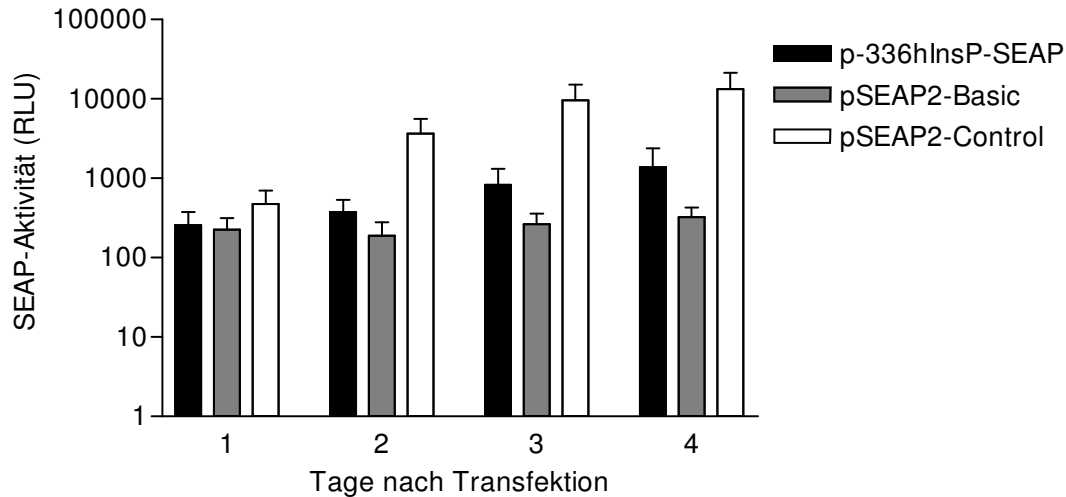
Da zum Zeitpunkt der Experimente noch kein Transfektionsprotokoll für primäre humane  $\beta$ -Zellen etabliert war, wurden initial verschiedene Transfektionsreagentien auf ihre Eignung überprüft. Getestet wurden Metafectene<sup>®</sup>, Fugene<sup>®</sup>, ExGen500<sup>®</sup>, Superfect<sup>®</sup>, Lipofectamine<sup>®</sup> und Effectene<sup>®</sup> (siehe Abb. 4.6.).



**Abb. 4.6.: Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen.** Liposomale Transfektion von primären humanen  $\beta$ -Zellen mit dem Vektor p-336hInsP-SEAP mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien. Entnahme von Zellkulturüberstand und Bestimmung der Aktivität des humanen Insulingenpromotors 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion. Mittelwert  $\pm$  SD (n=3). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Mittel aus drei Experimenten als Duplikat. SEAP, *secreted alkaline phosphatase*; RLU, *relative light units*.

Dabei zeigte die Transfektion mit dem Reagenz Effectene<sup>®</sup> den größten Erfolg. Denn nur hier lässt sich eine SEAP-Akkumulation im zeitlichen Intervall zwischen 24 und 96 Stunden erkennen, während sich bei Gebrauch der restlichen Reagenzien nur geringe oder gar keine Veränderungen zeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Transfektionen von primären humanen  $\beta$ -Zellen mit dem Reagenz Effectene<sup>®</sup> durchgeführt.

Wie in Abb. 4.7. zu erkennen, liegt die Aktivität des Vektors p-336hInsP-SEAP in primären humanen  $\beta$ -Zellen deutlich über der der Negativkontrolle pSEAP2-Basic, jedoch nicht über der Aktivität der Positivkontrolle pSEAP2-Control, wie dies in INS-1- $\beta$ -Zellen (Abb. 4.1.B.) der Fall ist.



**Abb. 4.7.: Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen.** Liposomale Transfektion von primären humanen  $\beta$ -Zellen mit pSEAP2-Basic als Negativkontrolle, pSEAP2-Control als Positivkontrolle und p-336hInsP-SEAP (jeweils 0,4  $\mu$ g DNA) zur Bestimmung der Aktivität des humanen Insulingenpromotors. Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Die gezeigten Ergebnisse sind ein Mittel aus drei Experimenten als Duplikat. SEAP, *secreted alkaline phosphatase*; RLU, *relative light units*.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transfektion von primären humanen  $\beta$ -Zellen mittels Effectene<sup>®</sup> möglich ist und eine ausreichende Sensitivität des Systems gewährleistet ist.

Von der ursprünglich geplanten Herstellung adenoviraler Vektoren zur Erhöhung der Transfektionseffizienz konnte nach diesen Ergebnissen abgesehen werden, da die extrem hohe Sensitivität dieses Systems auch die nonvirale Untersuchung der Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen erlaubt.



## 5. Diskussion

### 5.1. Etablierung eines Systems zur hochsensitiven Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors

Zum Verständnis des Diabetes mellitus werden Informationen über die Regulation der Insulinbiosynthese benötigt. Generell werden solche Experimente bis jetzt in Tiermodellen untersucht, da menschliche Zellen in der Verfügbarkeit limitiert sind, in vitro nicht proliferieren und deshalb schwer zu transfizieren sind.

Zum Erhalt detaillierter Informationen über die Aktivität des humanen Insulingenpromotors sowohl in primären humanen  $\beta$ -Zellen als auch in speziesdifferenten  $\beta$ -Zellen wurde ein Vektor kloniert, der das SEAP-Reportergen unter Kontrolle des -336 bp langen humanen Insulingenpromotors enthält. Um das System zu testen wurden mit diesem Vektor, dessen 5'-Deletionskonstrukten, sowie Positiv- (pSEAP2-Control) und Negativkontrolle (pSEAP2-Basic) INS-1- und beta-TC3-Zellen liposomal transient transfiziert.

Zum Erhalt von Informationen über die detaillierte Analyse der Funktion des humanen Insulingenpromotors in menschlichen Zellen wurde das in speziesdifferenten Zelllinien bereits etablierte System mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien in primären humanen  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen getestet und schließlich mit dem Transfektionsreagenz Effectene<sup>®</sup> ebenfalls etabliert.

Zusammenfassend wurde also eine Methode entwickelt, welche erstmals die Analyse der Aktivität des humanen Proinsulins in primären insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Menschen erlaubt.

Außerdem wurde durch die Entwicklung dieser Methode eine wichtige Alternative zur material- und aufwandsintensiveren sowie teureren Methode der adenoviralen Transfektion von primären humanen  $\beta$ -Zellen des Menschen entwickelt.

Die Ergebnisse dieser Experimente liefern neue Einsichten in die molekulare Regulation der Insulinbiosynthese im endokrinen Pankreas des Menschen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Diabetes mellitus.

## **5.2. Testung der Deletionskonstrukte in INS-1- und beta-TC3-Zellen**

In beiden Zelllinien nahm erwartungsgemäß (18, 24, 44, 45) die Aktivität des humanen Insulingenpromotors bei steigender Glucosekonzentration zu. Wider Erwarten (18, 24, 44, 45) zeigte sich in ebenfalls beiden Zelllinien keine ausgeprägte Abnahme der Aktivität des humanen Insulingenpromotors zwischen dem längsten und dem kürzesten Deletionskonstrukt.

Bei allen Transfektionsserien zeigte sich die größte Abnahme der Aktivität des humanen Insulingenpromotors bereits zwischen den Konstrukten p-336hInsP-SEAP und p-311hInsP-SEAP. Zwischen -317 und -313 bp innerhalb der Sequenz des humanen Insulingenpromotors befindet sich das A5-Element. An dieses Element bindet PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox-1*). PDX-1 ist ein Hauptaktivator der Insulingenexpression (18, 34), der allerdings ebenfalls an das A3- und A1-Element bindet, die sich nicht in diesem Bereich des humanen Insulingenpromotors befinden. So lässt sich die stark ausgeprägte Abnahme der transkriptionellen Aktivität des humanen Insulingenpromotors nicht alleine durch den für PDX-1 fehlenden Bindungspartner, das A5-Element, erklären. Die Aktivität der humanen Insulingenpromotors unterliegt einer komplexeren Regulation.

### 5.3. Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit zur Bestimmung der Analyse der Aktivität des humanen Proinsulingenpromotors in Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Menschen entwickelt. Mit der Testung der im Rahmen dieser Arbeit klonierten 5'-Deletionskonstrukte des humanen Insulingenpromotors in primären humanen  $\beta$ -Zellen lassen sich neue Erkenntnisse über die molekulare Regulation der Insulinbiosynthese gewinnen, die sowohl für das Verständnis als auch für die Therapie des Diabetes mellitus unerlässlich sind.

Für das exakte Verständnis der komplexen molekularen Regulation der Insulinbiosynthese im endokrinen Pankreas des Menschen sind ferner Untersuchungen der Aktivität des humanen Insulingenpromotors unter dem Einfluss unterschiedlicher Hormone und Nährstoffe, wie z.B. Insulin, GLP-1 (*Glucagon-like peptide*), PRL (Prolactin) und PL (Placentalaktogen) sowohl in insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Menschen als auch in speziesdifferenten insulinproduzierenden Zellen erforderlich.

## 6. Zusammenfassung

Die Insulinbiosynthese in  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas wird auf transkriptioneller Ebene durch die Aktivität des Insulingenpromotors reguliert. Die detaillierte Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors erfolgte bisher nur in speziesdifferenten  $\beta$ -Zelllinien, da glukosesensitive  $\beta$ -Zelllinien aus dem Pankreas des Menschen nicht verfügbar sind.

Es ist jedoch bekannt, dass signifikante Unterschiede in der transkriptionellen Regulation der Genexpression in unterschiedlichen Spezies existieren. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe die spezifische Untersuchung der Regulation des humanen Insulingenpromotors hochsensitiv in primären humanen  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen möglich ist. Dazu wurde ein Vektor kloniert, der das SEAP (*secreted alkaline phosphatase*)-Reportergen unter der Kontrolle des -336 bp langen humanen Insulingenpromotors enthält. Im Laufe verschiedener Transfektionsexperimente mit dem Vektor p-336hInsP-SEAP, pSEAP2-Control (Positivkontrolle) und pSEAP2-Basic (Negativkontrolle) sowohl in INS-1- $\beta$ -Zellen, in beta-TC3-Zellen als auch in primären humanen  $\beta$ -Zellen, zeigten sich in den luminometrisch bestimmten SEAP-Aktivitäten, die als Maß für die Aktivität des humanen Insulingenpromotors dienen, deutliche Unterschiede zwischen den transkriptionellen Aktivitäten der einzelnen Vektoren. Dieses System eignet sich also ausgezeichnet für die hochsensitive Analyse der Insulingenpromotoraktivität. Zur detaillierteren Analyse wurden 5'-Deletionskonstrukte des Vektors p-336hInsP-SEAP konstruiert und damit INS-1- und beta-TC3-Zellen transient transfiziert. In beiden Zelllinien wurden Experimente bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen durchgeführt, um daraus Rückschlüsse auf die Glukoseresponsivität des humanen Insulingenpromotors ziehen zu können. Dabei zeigte der humane Insulingenpromotor die aus Versuchen mit dem Ratteninsulingenpromotor 1 (19, 20, 21, 22) erwartete Glukoseresponsivität. Allerdings ließ sich keine

Abnahme der transkriptionellen Aktivität des Promotors bei Abnahme der Länge der Konstrukte beobachten.

Unter Verwendung von Effectene<sup>®</sup> als Transfektionsreagenz eignet sich das SEAP-System zur Analyse der Aktivität des humanen Insulingenpromotors in primären insulinproduzierenden Zellen aus dem menschlichen Pankreas.

Anhand der Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit lassen sich neue Erkenntnisse der molekularen Regulation der Insulinbiosynthese im endokrinen Pankreas des Menschen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Diabetes mellitus gewinnen.

## 7. Literatur

- (1) **Hauner H, Köster.I, Schubert I** 2007 Trends in der Prävalenz und ambulanten Versorgung von Menschen mit Diabetes mellitus. Dtsch Arztebl 2007; 104(41): A 2799-805
- (2) **W. A. Scherbaum** 1999 Kapitel "Endokrinologie" in Thiemes Innere Medizin (TIM), Thieme
- (3) **Naftanel MA, Harlan DM.** 2004 Pancreatic Islet Transplantation. PloS Medicine. 1(3)/2004. The Public Library of Science, S e58ff.
- (4) **Penfornis A, Kury-Paulin S** 2006 Immunosuppressive drug-induced diabetes. Diabetes & Metabolism. 32(5)/2006. Masson, S. 539–546
- (5) **Merani S, Shapiro AM** 2006 Current status of pancreatic islet transplantation. Clinical Science. 110/2006. Portland Press, S. 611–625,
- (6) **DeFronzo RA** 1988 Lilly Lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. Diabetes 37:667-87
- (7) **Hauner H** 1998 Occurrence of diabetes mellitus in Germany. Dtsch Med Wochenschr 123:777-82
- (8) **Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC,** 2003 Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. Diabetes. 2003 Sep; 52(9): 2304-14.
- (9) **Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU** 2000 Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. Endocr Rev 21:585-618
- (10) **DeFronzo RA, Ferrannini E** 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care 14:173-94
- (11) **Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE** 1991 Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. Lancet 338:774-8

- 
- (12) **King H, Aubert RE, Herman WH** 1998 Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-31
- (13) **Ferrannini E** 1998 Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19:477-90
- (14) **Gerich JE** 1998 The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19:491-503
- (15) **Harper ME, Ullrich A, Saunders GF** 1981 Localization of human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4458-4460
- (16) **Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC** 1985 Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet* 19:463-484
- (17) **Pschyrembel** 1998 *Klinisches Wörterbuch*, "Insulin". 258:766
- (18) **Melloul D, Marshak S, Cerasi E.** 2002 Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-326
- (19) **Nielsen DA, Welsh M, Casadaban J, Steiner DF** 1985 Control of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. *J Biol Chem* 260:13585-13589
- (20) **Welsh M, Brunstedt J, Hellerstrom C** 1986 Effects of D-glucose, L-leucine and 2-ketoisocaproate on insulin mRNA levels in mouse pancreatic islets. *Diabetes* 35:228-231
- (21) **Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF** 1988 Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55:281-290
- (22) **Matschinsky FM** 1990 Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647-652
- (23) **Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CV, Towle HC, Rodertson RP, Stein R** 1995 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 USA* 92:9127-31
- (24) **German MS, Wang J** 1994 The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol* 14:4067-4075
- (25) **Sander M, Griffen SC, Huang J, German MS** 1998 A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11572-11577
- (26) **Argoud GM, Schade DS, Eaton RP** 1987 Insulin suppresses its own secretion in vivo. *Diabetes* 36:959-962
- (27) **Rutter GA** 1999 Insulin secretion: feed-forward Control of insulin biosynthesis? *Curr Biol* 9:R443-445
- (28) **Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H et al.** 1998 Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904
- (29) **Leibiger B, Leibiger IB, Moede T et al.** 2001 Selective insulin signalling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 7:559-570
- (30) **Holz GG, Leech CA** 2001 Glucagon-like peptide-1: An insulinotropic hormone with potent growth factor actions at the pancreatic islets of Langerhans. In Habener JF, Hussain MA (eds) *Molecular Basis of Pancreas Development and Function*. Kluwer Acad Pub, Norwel, 109-141
- (31) **Seufert J** 2004 Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S152-8.
- (32) **Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N** 1996 Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol Endocrinol* 10:652-660
- (33) **Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A et al.** 2001 Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 50 [Suppl 1]:S25-S29
- (34) **Odagiri H, Wang J, German M** 1996 Function of the human insulin promoter in Primary cultured islet cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 4, pp. 1909-1915.



- 
- (35) **Read ML, Clark AR, Docherty K** 1993 The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem J* 295:233-237
- (36) **Grill V, Cerasi E** 1974 Stimulation by D-glucose of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat. *J Biol Chem* 249:4196-4201
- (37) **Read ML, Masson MR, Docherty K** 1997 A RIPE3b1-like factor binds to a novel site in the human insulin promoter in a redox-dependent manner. *FEBS Lett* 418:68-72
- (38) **Dohrmann C, Gruss P, Lemaire L** 2000 Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 92:47-54
- (39) **Bennett ST, Todd JA** 1996 Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 30:343-370
- (40) **Ong KK, Phillips DI, Fall C et al.** 1999 The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nat Genet* 21:262-263
- (41) **Goodman PA, Medina-Martinez O, Fernandez-Mejia C** 1996 Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol* 120:139-146
- (42) **Clark AR, Wilson ME, Leibiger I, Scott V, Docherty K** 1995 A silencer and an adjacent positive element interact to modulate the activity of the human insulin promoter. *Eur J Biochem* 232:627-632
- (43) **Inoue H, Nojima H, Okayama H** 1990 High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-8
- (44) **Odagiri H, Wang J, German M** 1996 Function of the human insulin promoter in Primary cultured islet cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 4, pp. 1909-1915.
- (45) **Ohneda K, Ee H, German M** 2000 Regulation of insulin gene transcription. *Cell & Develop. Biol.* 11:227-233

## 8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. J. Seufert für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit, für seine gute Betreuung, für die Beantwortung vieler meiner Fragen und für die stets gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Jakob für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. rer. nat. Günter Päth für die vielen Hilfestellungen bei fachlichen, technischen und insbesondere computertechnischen Problemen.

Allen Mitarbeitern des Hormonlabors der Medizinischen Poliklinik und bei meinen Mitdoktoranden für das kollegiale Miteinander und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets motivierten und auch bei vielen Fragen und Problemen eine wichtige Hilfe waren.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Silke Andrea Hohloch  
Geburtstag/-ort: 16.05.1979, Reutlingen

### Schulbildung

09/1985 – 07/1989: Grundschule: Hohbuchschole, Reutlingen  
09/1989 – 06/1998: Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen  
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### Freiwilliges soziales Jahr

09/1998 – 08/1999: Tropenlinik, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen

### Praktische Tätigkeiten

09/1999 – 10/1999: Nachtwache in der Tropenlinik, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen  
11/1999 – 12/1999: Pflegepraktikum in der Chirurgischen Klinik im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen  
01/2000 – 02/2000: Bürotätigkeit bei der Firma Wavetech Wandel Goltermann, Eningen

### Studium

04/2000: Beginn des Humanmedizinstudiums an der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg  
03/2002: Ärztliche Vorprüfung  
03/2003: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/2005: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/2005 – 09/2006: Praktisches Jahr, Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe  
11/2006: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation als Ärztin

### Beruf

14.5.2007-30.6.2008: Assistenzärztin, Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, Katharinenhospital Stuttgart  
seit 15.6.2008: Assistenzärztin, Frauenklinik, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen

Reutlingen, den 07.10.2008