

**Gentechnologische Reduktion der Expression des Autoantigens
Glutamatdecarboxylase (GAD) in insulinproduzierenden Zellen
des endokrinen Pankreas**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Maria Lazariotou

aus
Öhringen

Würzburg 2008

Eingereicht am: 11.04.2008

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

Gutachter : PD Dr. Sigrun Merger

Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums: 10.12.2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Danksagung

Den Herrn Professores Dr. Wilms und Dr. Seufert danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Herr Professor Dr. Wajant und die Dres D. Siegmund, I. Chodnevskaja, C. Mielke und U. Rdest haben durch Einarbeitung und freundschaftlich kompetente Beratung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Hormonlabors für die Hilfe im Laboralltag.

Besonders danke ich Frau Professor Dr. Ulrichs, die nach der Emeritierung von Herrn Professor Dr. Wilms und dem Universitätswechsel von Herrn Professor Dr. Seufert umsichtig und zielführend die vorliegende Arbeit wohlwollend begleitet hat und auch Frau PD Dr. Merger für die anregenden Ideen, sachbezogenen Diskussionen und Begutachtung der Dissertationsschrift, sowie Herrn Professor Dr. Benz für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem IZKF danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie für die aufmunternden Worte, die Motivation und Unterstützung in kritischen Zeiten.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	4
3.1. Der Diabetes mellitus	4
3.2. Das Inselorgan der Bauchspeicheldrüse (Pankreas)	4
3.3. Eigenschaften, Biosynthese und Wirkung von Insulin	5
3.3.1. Pankreatische Beta-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren	6
3.3.2. Pankreatische Beta-Zell-spezifische Genexpression	7
3.3.3. Insulinsekretion	7
3.3.4. Glukose-induzierte Insulinsekretion	7
3.4. Pathogenese des Typ 1 Diabetes	8
3.4.1. Die Organisation des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)	10
3.4.2. Subpopulationen von T-Lymphozyten	11
3.4.3. Effektorzellen und Mechanismen der zellulären Zytotoxizität in pankreatischen Beta-Zellen	11
3.4.4. Apoptose	12
3.4.5. Beta-Zell-Autoantigene	15
3.4.6. Experimentelle Modelle des Typ 1 Diabetes	19
3.5. Therapieformen des Diabetes mellitus	19
3.5.1. Medikamentöse Therapie	19
3.5.2. Zelltherapie einschließlich Inselzelltransplantation	20
3.6. Immunprotektion von Beta-Zellen bei Typ 1 Diabetes	21
3.7. Zielsetzung der Arbeit	22
4. Material	23
4.1. Geräteliste (alphabetisch)	23
4.2. Chemikalien, biochemische Reagenzien, Zellkulturmedien	25
4.3. Laborkits	27
4.4. Größenstandards	27
4.5. Oligonukleotidprimer	27
4.6. Bakterienstämme	28
4.7. Antikörper und Zytokine	29
4.8. Expressionsvektoren	29

4.9.	Zelllinien	30
4.10.	Lösungen	30
4.11.	Computersoftware	30
5.	Methoden	31
5.1.	Methoden zur Zellkultur	31
5.1.1.	Die insulinsezernierende Zelllinie INS-1	31
5.1.2.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	31
5.1.3.	Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypanblau	32
5.1.4.	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	32
5.1.5.	Die COS-7 Zelllinie	33
5.1.6.	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	33
5.1.7.	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA	34
5.1.8.	Aufbewahren von Zellen	35
5.1.9.	Auftauen von Zellen	35
5.1.10.	Isolierung der Klone mittels Agarose	35
5.1.11.	Inaktivierung von Genen – Das Prinzip der antisense Technik	36
5.1.12.	Spezifische Inhibition von Genen durch RNA-Interferenz	37
5.2.	Molekularbiologische Methoden	37
5.2.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen	37
5.2.2.	RNA-Isolierung	38
5.2.3.	DNase-Behandlung der RNA	38
5.2.4.	Reverse Transkription (RT)	39
5.2.5.	Amplifikation von DNA mithilfe der PCR	39
5.2.6.	Positivkontrollen der RT-PCR	43
5.2.7.	Negativkontrollen der RT-PCR	43
5.2.8.	Interne Kontrollen der RT-PCR	43
5.2.9.	Agarosegelelektrophorese	43
5.2.10.	Sequenzierung	44
5.2.11.	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	46
5.2.12.	Glatte und kohäsive Enden	46
5.2.13.	Dephosphorylierung geschnittener DNA	47
5.2.14.	Aufpolymerisieren von 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen	47

5.2.15.	Elution von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus Agarosegelen	47
5.2.16.	Reinigung und Konzentrierung von DNA	47
5.2.17.	Ligation von DNA-Fragmenten	48
5.2.18.	Messung der optischen Dichte von Bakterien	48
5.2.19.	Herstellung von kompetenten E. coli Zellen	48
5.2.20.	Transformation durch 'Hitzeschock'	49
5.2.21.	Aufbewahren von Bakterien	50
5.2.22.	Anzucht und Kultur von Bakterien	50
5.2.23.	Präparation von Plasmid-DNA	51
5.3.	Proteinbiochemische Methoden	51
5.3.1.	Herstellung von Kernextrakten aus Säugerzellen	51
5.3.2.	Herstellung von Zellysaten für Westernblot	52
5.3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
5.3.4.	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	54
5.3.5.	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels Westernblot	56
5.3.6.	Entwickeln des Immunoblot	57
5.3.7.	Anfärben der Membran mit Coomassie Brilliant Blue	58
5.3.8.	Anfärben des Polyacrylamid-Gels mit Coomassie Brilliant Blue	58
5.3.9.	Strippen von Westernblots	59
5.4.	Zellbiochemische Untersuchungen	59
5.4.1.	Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay	59
5.4.2.	Versuche zur Glukose-induzierten Insulinsekretion	60
5.4.2.1.	Sezerniertes Insulin im Zellkulturüberstand	60
5.4.2.2.	Intrazelluläres Insulin im Zellysat	62
5.4.2.3.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	62
5.5.	Statistische Analyse	63
6.	Ergebnisse	64
6.1.	GAD Expression in INS-1 Beta-Zellen	64
6.1.1.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1 ⁺ GAD65 (7,7 kb)	65
6.1.1.1.	Klonierungsstrategie	65

6.1.2.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1 ⁺ GAD67 (8 kb)	66
6.1.2.1.	Klonierungsstrategie	66
6.1.3.	Klonierung des antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1 ⁺ ZeoGAD67 (9,1 kb)	68
6.1.3.1.	Klonierungsstrategie	68
6.2.	Strategien zur gezielten Suppression endogener GAD65 mRNA Expression in INS-1 Beta-Zellen	69
6.2.1.	GAD65 siRNA Transfektion in INS-1 Beta-Zellen	69
6.2.1.1.	PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion	69
6.2.2.	Stabile Überexpression von GAD65 sense und antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen	71
6.2.2.1.	PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion	71
6.2.3.	Suppression der endogenen GAD65 mRNA Expression nach stabiler Überexpression von GAD65 antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen	72
6.2.3.1.	PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion	72
6.2.4.	Einfluss der Suppression von GAD65 auf die pankreatische Beta-Zell- spezifische Genexpression	73
6.2.4.1.	Expression von Beta-Zell-spezifischen Genen	73
6.2.5.	Einfluss der Suppression von GAD65 auf die Insulinsekretionskapazität der Zellen	74
6.2.5.1.	Glukose-induzierte Insulinsekretion	74
6.2.6.	Einfluss der Suppression von GAD65 auf die apoptotischen Eigenschaften der Zellen	76
6.2.6.1.	Zytokin-induzierte Apoptose	76
6.3.	Strategie zur gezielten Suppression endogener GAD67 mRNA Expression in INS-1 Beta-Zellen	78
6.3.1.	PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion	78
6.4.	Das Tet-on-System	79
6.4.1.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD65 (5,4 kb)	80
6.4.1.1.	Klonierungsstrategie	80
6.4.2.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65 (8,5 kb)	81

6.4.2.1.	Klonierungsstrategie	81
6.4.3.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 (9,6 kb)	83
6.4.3.1.	Klonierungsstrategie	83
6.4.4.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD67 (5,7 kb)	84
6.4.4.1.	Klonierungsstrategie	84
6.4.5.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR GAD67 (8,7 kb)	85
6.4.5.1.	Klonierungsstrategie	85
6.4.6.	Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR-Bsd GAD67 (10 kb)	86
6.4.6.1.	Klonierungsstrategie	86
6.4.7.	Transiente Transfektion von INS-1 Zellen mit dem sense und antisense Vektorkonstrukt pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 (9,6 kb)	87
6.5.	GAD Expression in primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen	89
6.5.1.	Klonierung des humanen sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD65 (5 kb)	90
6.5.1.1.	Klonierungsstrategie	90
7.	Diskussion	91
7.1.	Entwicklung und Optimierung von gentechnologischen Verfahren zur Verminderung der GAD65 Expression in INS-1 Zellen	91
7.1.1.	Suppression der GAD65 Expression durch RNA-Interferenz (siRNA) in INS-1 Beta-Zellen	91
7.1.2.	Suppression der GAD65 Expression durch antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen	92
7.2.	Charakterisierung von INS-1 Zellen mit verminderter GAD65 Expression	93
7.2.1.	Pankreatische Beta-Zell-spezifische Genexpression in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen	93
7.2.2.	Glukose-induzierte Insulinsekretion in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen	94

7.2.3.	Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose ist erhalten in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen	95
7.3.	Ausblick	97
7.4.	Alternativen zur Generierung von funktionsfähigen insulinbildenden Zellen	98
7.4.1.	Pankreastransplantation	98
7.4.2.	Inselzelltransplantation	99
7.4.2.1.	Das Schwein als Quelle für insulinproduzierende Zellen	100
7.4.2.2.	Immunisolation als Lösung der Transplantatabstoßung	101
7.4.3.	Regeneration von Beta-Zellen	102
7.4.4.	Gentherapie	102
7.4.5.	Stammzellen	104
7.4.5.1.	Embryonale Stammzellen	105
7.4.5.2.	Adulte Stammzellen	106
8.	Literaturverzeichnis	110
9.	Anhang	133
9.1.	Abkürzungen	133
9.2.	Publikationsliste	138
9.3.	Lebenslauf	139

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden ob durch Reduktion der Glutamatdecarboxylase (GAD) Expression eine Reduktion des autoimmunogenen Potenzials in insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas erreicht werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass GAD als Autoantigen eine zentrale Stellung bei der Induktion der T-Zell vermittelten Insulinitis einnimmt. Der Prozess, welcher zur Beta-Zell-Apoptose des Typ 1 Diabetes führt, ist ein bislang wenig verstandener komplexer Vorgang. Ein besseres Verständnis dieses Prozesses könnte zur Prävention der Beta-Zell-Zerstörung in der frühen Phase des Typ 1 Diabetes beitragen. In den für die Untersuchungen verwendeten INS-1 Zellen werden die beiden Isoformen der GAD exprimiert. Durch einen antisense Ansatz sollte in INS-1 Zellen die GAD Expression beider Isoformen supprimiert werden. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur gezielten Suppression der Expression des Autoantigens GAD65 etabliert. Es konnte ein antisense Klon identifiziert werden, bei dem die endogene GAD65 mRNA fast nicht mehr detektierbar war. Auf Protein Ebene, im Westernblot konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion der INS-1 Zellen mit supprimierter GAD65 Expression charakterisiert. Dieser Punkt beinhaltet die Analyse der Expression von Genen, welche die Beta-Zell-Funktion definieren, die Glukose-abhängige Insulinsekretion sowie die Regulation der Zytokin-induzierten Apoptose. Dabei zeigte sich aus Daten der RT-PCR, dass die mRNAs von anderen Beta-Zell-spezifischen Genen wie GLUT2, Glukokinase, Proinsulin, IDX1 und Nkx6.1 in unveränderter Menge nachweisbar sind. Also bleibt die Funktion der INS-1 Beta-Zellen erhalten, da selbst durch forcierte Reduktion der Expression des Autoantigens GAD65 die Glukose-induzierte Insulinsekretionskapazität im Wesentlichen nicht beeinträchtigt wird. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine unveränderte Sensitivität der Zytokin-induzierten Apoptose nach GAD65 Suppression in INS-1 Zellen. Die zuvor genannten Resultate und die Tatsache, dass die GAD wohl eines der wichtigsten Autoantigene im Rahmen der Immunpathogenese des Typ 1 Diabetes ist, stellen die Grundlage für die Generierung GAD-supprimierter transplantierbarer Beta-Zellen mit guter Transplantatfunktion dar. Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung bei der Behandlung dieser humanen Autoimmunerkrankung demonstrieren die vorliegenden Daten, dass im Rahmen einer Inselzelltransplantation die Verwendung von GAD-supprimierten Beta-Zellen bei der

Transplantation in das endokrine Pankreas des Menschen zu einer Verminderung von Autoimmunreaktionen führen könnte.

2. Summary

In the present study we investigated genetic engineering approaches for the suppression of autoantigenic GAD expression in insulin producing pancreatic beta-cells. The enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) represents a major autoantigen in the early immunopathogenesis of T-cell-mediated destruction of pancreatic beta-cells in type 1 diabetes mellitus. The mechanisms which trigger the apoptotic destruction of insulin producing pancreatic beta-cells leading to autoimmune diabetes are incompletely understood. The exact mechanisms remain to be clarified. The enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD), is expressed in INS-1 pancreatic beta-cells in two distinct isoforms GAD65 and GAD67. Thus, strategies to suppress GAD expression in INS-1 cell lines were tested. Two methods for suppression of autoantigenic GAD65 expression were established. One clone overexpression of GAD65 antisense mRNA yielded an almost complete suppression of endogenous GAD65 mRNA expression. In the second part of this thesis the characterization of INS-1 cells with suppressed autoantigenic GAD65 mRNA expression including beta-cell specific gene expression, glucose-dependent insulin secretion, and cytokine induced-apoptosis was tested. Expression of glucose transporter type 2, glucokinase, preproinsulin, islet/duodenum homeo box 1 transcription factor (IDX), and NK homeodomain transcription factor (Nkx6.1) were characterized by reverse transcription polymerase chain reaction. No differences in the amount of these beta-cell specific genes could be detected between GAD65 suppressed INS-1 cell clones and controls. Moreover, reduced GAD65 expression does not affect insulin secretory capacity in INS-1 cells. Suppression of GAD65 expression in INS-1 cells does not alter sensitivity to cytokine-induced apoptosis. The data presented here suggest that suppression of GAD expression may thus provide a therapeutical approach to prevent recurrence of autoimmune beta-cell destruction in transplanted pancreatic beta-cells in type 1 diabetic patients.

3. Einleitung

3.1. Der Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist definiert als absoluter oder relativer Insulinmangel mit nachfolgender Hyperglykämie [7, 25, 71]. Die Zuckerkrankheit Diabetes mellitus betrifft vor allem Menschen in den Industriestaaten. Allein in der Bundesrepublik leben derzeit ca. 5 Millionen Patienten mit Diabetes und die Häufigkeit der Erkrankung ist ansteigend. Eine wesentliche Ursache der Krankheit besteht entweder in einer Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen in der Bauchspeicheldrüse (Typ 1) oder in einer Fehlfunktion dieser Zellen (Typ 2). Kennzeichen beider Typen ist eine Störung der Aufnahme von Glukose in die Zellen und damit verbunden ein erhöhter Serumglukosespiegel. Jeder vierte Todesfall in Deutschland hängt mit der Zuckerkrankheit und ihren Spätfolgen zusammen. Bei Patienten mit Diabetes Typ 1 handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der eine fehlgesteuerte Immunantwort die insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse zerstört, sodass die Insulinsekretion nicht mehr ausreicht, um die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten, und eine exogene Insulinzufuhr erforderlich wird [7, 14, 33, 53, 80, 99].

3.2. Das Inselorgan der Bauchspeicheldrüse (Pankreas)

In der Bauchspeicheldrüse, dem *Pankreas*, sind zwei Organe ineinandergefügt, eine exokrine Drüse – das exokrine Pankreas ist die wichtigste Verdauungsdrüse – und eine endokrine Drüse, das Inselorgan, welches Hormone produziert, die den Blutzuckerspiegel konstant halten und den Einstrom von Glukose in die Zellen regulieren. Der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse besteht aus etwa 1–2 Millionen Inseln (Langerhans-Inseln), die in ihrer Summe als Inselorgan bezeichnet werden. Die Inseln bestehen aus Drüsenzellen. Als wichtigste Hormone werden Insulin (Beta-Zellen), Glukagon (Alpha-Zellen) und Somatostatin (Delta-Zellen) produziert [7, 64], wobei Insulin und Glukagon eine antagonistische Wirkung besitzen. Somatostatin hingegen hemmt über einen parakrinen Einfluss die Freisetzung sowohl von Insulin als auch von Glukagon. Beim gesunden Erwachsenen produzieren etwa 60 % aller Zellen Insulin, 25 % Glukagon und 15 % Somatostatin. Insulin und Glukagon kontrollieren die Blutglukosekonzentration und halten sie möglichst konstant (3,3–5,5 mmol/l). Insulin fördert in der Leber die Glykogensynthese und erleichtert die Aufnahme von Glukose in die Zellen, womit es den

Blutzuckerspiegel senkt. Unter der Wirkung von Glukagon wird Glykogen in der Leber zu Glukose abgebaut (Glykogenolyse) und somit der Blutzuckerspiegel erhöht.

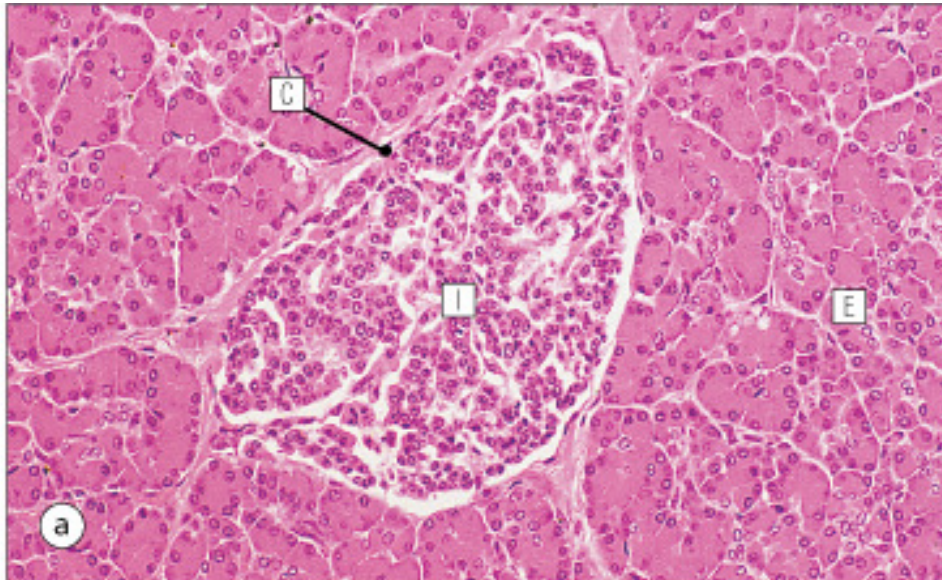


Abbildung 1: Inselorgan im menschlichen Pankreas. Innerhalb des exokrinen Pankreasgewebes liegen die Langerhans-Inseln. Durch die Fibrokollagenase Kapsel wird das exokrine Pankreas von den Langerhans-Inseln getrennt [43].

(I = Langerhans-Inseln, E = Exokrines Pankreas, C = Fibrokollagenase Kapsel, Vergrößerung 400fach).

3.3. Eigenschaften, Biosynthese und Wirkung von Insulin

Insulin ist ein α -helikales Protein mit einem Molekulargewicht von 5.700 Da. Die biologische Vorstufe des Insulins ist das Proinsulin. Im Proinsulin sind die A- und B-Kette durch das C-Peptid (*connecting peptide*) verbunden. Das fertige Insulin-Molekül besteht aus zwei Polypeptiden, der A-Kette mit 21 und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, die durch zwei Disulfidbrücken, verbunden sind. Die Aminosäuresequenz von Insulin wurde im Jahre 1953 von Sanger und Mitarbeitern aufgeklärt. Insulin wird als einsträngiges Präprohormon aus 114 Aminosäuren im endoplasmatischen Retikulum der Inselzellen gemeinsam mit Hüllproteinen synthetisiert [157]. In den sekretorischen Granula der Beta-Zelle erfolgt die Umwandlung des Proinsulins zum Insulin, wobei das C-Peptid aus dem Proinsulin herausgeschnitten wird. Das Gen für Insulin liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11. Es besteht aus einer Signalsequenz (*L, Leader*) und zwei Exons. Mit 1.430 Basenpaaren ist es ein kleines Gen, welches in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln exprimiert wird. Insulin stimuliert den zellulären Glukosestoffwechsel,

die Glykogenese, Lipogenese und Proteogenese. Verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie IDX1, C/EBP β und Nkx6.1 regulieren die Insulingenexpression.

3.3.1. Pankreatische Beta-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren

Die molekularen Mechanismen der Pankreasentwicklung sind bislang nur inkomplett verstanden [18, 36, 126]. Verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Organogenese und Differenzierung der pankreatischen Zelltypen, wie z. B. PDX1, Pax4, Pax6, Nkx6.1, BETA2/NEUROD. Die *Homeo Box* ist ein stets wiederkehrendes Motiv in Genen, welche die Entwicklung von Insekten und Wirbeltieren steuern. Sie wurden ursprünglich in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt [81]. *Homeo* Domänen dienen in allen untersuchten Eukaryoten, von der Hefe bis zum Menschen, als Regulatoren der Genexpression. Das Sequenzmotiv der *Homeo Box* Gene enthält eine 60 Aminosäuren umfassende *helix-turn-helix* Struktur. Der Transkriptionsfaktor PDX1 (auch IDX1, IPF1 und STF1 genannt) gehört zur Gruppe der *Homeo Box* Gene [141]. Zum einen ist PDX1 notwendig für die Differenzierung des Pankreas, denn sein Fehlen führt zur Pankreasagenesie; zum anderen stellt er eine zwingende Voraussetzung für die Insulinexpression dar. Weiterhin wurde belegt, dass PDX1 in der Expression spezifischer Beta-Zell-Gene involviert ist, wie z. B. GLUT2, IAPP und Glukokinase [104, 144]. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass PDX1 in der Glukose-regulierenden Expression des GAD67 Gens beteiligt ist [104]. Die Nkx Gene gehören zur heterologen Gruppe der *NK Homeo Box* Gene. Der zu dieser Gruppe dazugehörige Transkriptionsfaktor Nkx6.1 ist notwendig für die Differenzierung der pankreatischen insulinproduzierenden Beta-Zellen [65, 154]. Die Pax Gene umfassen eine neunköpfige Familie von Transkriptionsfaktoren, welche in vier Subgruppen unterteilt wird: Pax1/9, Pax2/5/8, Pax3/7, Pax4/6 [24, 33]. Das gemeinsame Merkmal dieser Gene ist die 128 Aminosäuren umfassende *Paired Box*. Durch Ausbildung zweier Helix-Drehung-Helix-Strukturen ermöglicht die *Paired* Domäne dem jeweiligen Protein Sequenz-spezifische DNA-Bindung. Die Aktivität der Pax Gene ist entscheidend für die Entwicklung unterschiedlicher Organe wie Auge, Gehirn, Pankreas, Mittelohr, Niere und Schilddrüse. Pax4 und Pax6 werden während der Pankreasentwicklung exprimiert. Pax6 ist ein essenzieller Transkriptionsfaktor zur Differenzierung von Alpha-Zellen. Im Gegensatz dazu, beschränkt sich die Aktivität des Transkriptionsfaktors Pax4 nicht nur auf die insulinproduzierenden Beta-Zellen, sondern auch auf die somatostatinproduzierenden Delta-Zellen der Bauchspeicheldrüse. Sosa-

Pineda und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die gezielte Geninaktivierung von Pax4 in der Maus zu einem Ausbleiben der Ausreifung von insulinproduzierenden Beta-Zellen und somatostatinproduzierenden Delta-Zellen des Pankreas führt. Folglich sterben die Tiere nach der Geburt an Diabetes [22].

3.3.2. Pankreatische Beta-Zell-spezifische Genexpression

Gene und Proteine, welche spezifisch die Beta-Zell-Funktion definieren, bzw. für die Ausprägung des Beta-Zell-Phänotyps verantwortlich sind, sind, außer den bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren, u. a. GLUT2 und Glukokinase [93]. Die Aufnahme von Glukose in die Zelle erfolgt über Transmembranproteine, die Glukosetransporter. Inzwischen sind verschiedene Isoformen der Glukosetransporter-Familie (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4) bekannt, die anhand ihrer Primärstruktur, Funktion und dem Gewebeexpressionsmuster unterschieden werden. Die Glukokinase ist das Schlüsselenzym der Glukose-induzierten Insulinsekretion in den Beta-Zellen des Pankreas und des Glukosemetabolismus in der Leber. Das Enzym katalysiert bei physiologischen Glukosekonzentrationen (4–16 mM) den ersten Schritt der Glukoseverwertung in den Beta-Zellen und in der Leber [25]. Die Funktion der Glukokinase in der Leber unterscheidet sich von der Funktion der Glukokinase in der pankreatischen Beta-Zelle. Eine Erklärung hierfür wäre die Gensteuerung der Glukokinase. Dieses Gen besitzt zwei unterschiedliche Promotoren, wobei der eine Promotor nur in der Beta-Zelle 'aktiv' ist, der andere hauptsächlich in der Leber [87].

3.3.3. Insulinsekretion

Die Sekretion von Insulin aus den pankreatischen Beta-Zellen dient zur Regulierung des Blutglukosespiegels. Steigt nach der Nahrungsaufnahme die Glukosekonzentration im Blut an, wird Insulin aus den Speichergranula der Beta-Zellen durch Exozytose freigesetzt [121]. Dies führt zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zellen, zur Steigerung der Glykogenbildung in Leber und Muskel und zu vermehrtem oxidativem Glukoseabbau.

3.3.4. Glukose-induzierte Insulinsekretion

Substanzen, welche die Insulinfreisetzung induzieren, bezeichnet man als Initiatoren. Dazu gehören Kohlenhydrate, Aminosäuren und Arzneistoffe aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe [131]. Glukose ist der physiologische Hauptstimulus zur

Insulinsekretion von Beta-Zellen der Langerhans-Inseln in der Bauchspeicheldrüse [1]. Die Voraussetzung für die Glukose-induzierte Insulinsekretion ist deren Aufnahme in die Beta-Zelle. Durch den Glukosetransporter, ein Transmembranprotein, wird Glukose in das Zytoplasma der Beta-Zelle transportiert. An den Langerhans-Inseln der Ratte wird die Glukoseaufnahme hauptsächlich durch den Subtyp GLUT2 vermittelt. Zunächst erfolgt die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat durch die Hexokinase. Glukose-6-phosphat wird in der Glykolyse weiter umgesetzt, hierbei entstehen Pyruvat, ATP und $\text{NADH}+\text{H}^+$. Das Pyruvat wird in die mitochondriale Matrix eingeschleust, in deren die oxidative Decarboxylierung erfolgt. Das dabei entstandene Acetyl-CoA geht in den Zitratzyklus ein, wo wiederum $\text{NADH}+\text{H}^+$ und ATP gebildet werden. Durch die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten werden ATP-abhängige K^+ -Kanäle der Beta-Zelle geschlossen, infolgedessen wird die Zelle depolarisiert, wodurch sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen und Ca^{2+} in die Beta-Zelle einströmt. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration öffnen sich die Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanäle. Die Zelle wird repolarisiert durch den K^+ -Ausstrom, sodass sich die Ca^{2+} -Kanäle wieder schließen. Wenn der ATP/ADP-Quotient noch erhöht ist, wird über die Schließung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle die Beta-Zelle wieder depolarisiert und es erfolgt erneut ein Ca^{2+} -Einstrom. Durch dieses Wechselspiel zwischen Depolarisation und Repolarisation an der Zellmembran der Beta-Zelle entstehen oszillierende Ca^{2+} -Ströme, die mit der pulsatilem Insulinfreisetzung korrelieren. Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der Beta-Zelle führt schließlich zur Fusion der Insulingranula mit der Zellmembran [87, 119, 157]. Der genaue Mechanismus, über den eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Exozytose von Insulin auslöst, ist noch nicht bekannt.

3.4. Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Autoimmunkrankheiten werden durch Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene hervorgerufen [89]. Dies ist ein fehlerhafter Vorgang, der allen Autoimmunerkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis) gemeinsam ist, und dessen Ursachen weitgehend unbekannt sind. Wie bei den 'normalen' Immunreaktionen kann man auch bei Autoimmunkrankheiten zwischen humoralen und zellulären pathogenetischen Mechanismen unterscheiden. Nach heutigem Stand des Wissens handelt es sich beim Typ 1 Diabetes um eine autoimmun vermittelte Erkrankung [78, 100, 140, 151], die sich meist im jugendlichen Alter manifestiert. Durch das Auftreten von inflammatorischen Prozessen

[7, 53, 160] in den insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas kommt es zu einer chronisch fortschreitenden Entzündung der Langerhans-Inseln (Insulitis), zur selektiven Zerstörung dieser Zellen und somit zum absoluten Insulinmangel. Die Suszeptibilität für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes ist genetisch determiniert. Unter den Erkrankten finden sich gehäuft Träger der HLA-Antigene HLA-DR3 und HLA-DR4 [7]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass erstgradige Verwandte von Typ 1 Diabetikern ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber familiär unbelasteten Personen aufweisen [91]. Neben der genetischen Prädisposition entwickelt sich die Krankheit im Zusammenwirken mit Umweltfaktoren, wie z. B. Ernährungsgewohnheiten [27], geografischen und klimatischen Faktoren sowie Umweltgiften [31]. Weiterhin wird angenommen, dass Virusinfektionen [127] eine Insulitis auslösen. Diskutiert wird auch, dass die Insulitis bereits in den ersten Lebensjahren beginnt und 'negative' Umweltbedingungen die Zerstörung bzw. den Verlust der insulinproduzierenden Beta-Zellen beschleunigen. Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes ist somit durch eine immunologische Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen charakterisiert. Die genaue Ätiologie dieser zellvermittelten Immunogenität ist noch nicht aufgeklärt. Die krankhaften Autoimmunreaktionen, an denen vorrangig T-Lymphozyten und Makrophagen beteiligt sind, richten sich wahrscheinlich gegen körpereigene Membranstrukturen der Beta-Zelle. Autoreaktive T-Lymphozyten sind gegen Epitope körpereigener Antigene der Inselzellen wie z. B. GAD65, (Pro)insulin, ICA69 gerichtet [50, 132, 143]. Normalerweise wird die Aktivität der autoreaktiven T-Zellen durch die Suppressor T-Zellen unterdrückt. Die Aktivierung diabetogener T-Zellen, bei gestörter Funktion der zytotoxischen T-Zellen, könnte eine unkontrollierte klonale Expansion der autoreaktiven T-Zellen zur Folge haben. Somit könnte eine Kaskade von Entzündungsreaktionen ausgelöst werden, welche in der Zerstörung der Beta-Zellen gipfelt [110]. Im Rahmen der Pathogenese des Typ 1 Diabetes erfolgt die Aktivierung von T-Lymphozyten nur dann, wenn dem T-Zellrezeptor das zuvor 'prozessierte' Autoantigen zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert wird. Die Arbeitsgruppe von Yoon konnte zeigen, dass in den akzeptierten Tiermodellen für den Typ 1 Diabetes (NOD-Maus und BB-Ratte) die Inaktivierung von Makrophagen die Ausbildung einer Insulitis und die Entwicklung eines Diabetes verhindern kann [132, 162], was dem Prozess der Antigenpräsentation eine wesentliche pathogenetische Bedeutung zuschreibt. Neben der zellulären Immunität, die bei Patienten mit Diabetes Typ 1 zur Insulitis führt und damit die Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen zur Folge

hat, spielt auch die humorale Immunität eine wichtige Rolle. Die klinische Manifestation des Typ 1 Diabetes mit den klassischen Symptomen des akuten Insulinmangels erfolgt erst nach Zerstörung von 80–90 % der Beta-Zell-Masse. Nach Beginn der Insulintherapie setzt eine Remissionsphase ein, in der die Insulinsekretion etwas ansteigt. Ursachen hierfür sind die Abnahme der Insulinresistenz aufgrund der Normalisierung des Stoffwechsels sowie eine leichte Erholung der Funktion der Beta-Zellen.

3.4.1. Die Organisation des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)

Beim Menschen werden die MHC-Produkte als humane Leukozyten-Antigene (HLA) bezeichnet. Der MHC-Locus beim Menschen ist auf dem kurzem Arm des Chromosoms 6 lokalisiert [7], und beinhaltet über 200 Gene. Die meisten dieser Gene sind bei der Spezies Maus und bei der Spezies Mensch polymorph. Der MHC der Ratte, der auch als RT1 bezeichnet wird, entspricht in wesentlichen Anteilen dem HLA des Menschen und ist höchstwahrscheinlich auf dem Chromosom 20 lokalisiert. Beim Menschen ist der gesamte MHC-Locus in drei Regionen unterteilt, die jeweils eine Gruppe von Genen mit verschiedenen Allelen kodieren: Klasse I, Klasse II und Klasse III. Die sogenannten Klasse III-Genprodukte gehören nicht zu den sogenannten HLA-Antigenen, sondern sind Komplementfaktoren. Der T-Zellrezeptor erkennt ein Antigen niemals in freier Form, sondern immer nur den Komplex von Antigen und MHC-Produkt. Man nennt dies die MHC-Restriktion von T-Lymphozyten. Die für die meisten zytotoxischen T-Lymphozyten relevanten Antigene sind die sogenannten Klasse I-Antigene (beim Menschen HLA-A, B, und C), für die Mehrheit der Helfer T-Zellen sind die sogenannten Klasse II-Antigene (beim Menschen HLA-DP, DQ, DR) entscheidend [7, 146]. Der MHC setzt sich aus verschiedenen Regionen zusammen, die mit Großbuchstaben bezeichnet werden und jeweils eine Gruppe von Genen mit verschiedenen Allelen kodieren. Sie werden in die MHC-Klasse I, Klasse II und Klasse III unterteilt. Die sogenannten Klasse III-Genprodukte gehören nicht zu den HLA-Antigenen, sondern sind Komplementfaktoren. Beim Menschen setzt sich der MHC aus den Regionen D/DR, B, C, E, A, G und F zusammen. Bei der Ratte besteht die MHC-Klasse I aus der A und der C/E Region und die MHC-Klasse II ist in die Regionen B und D unterteilt. Alle kernhaltigen Zellen des Körpers exprimieren MHC-Klasse I-Antigene, allerdings in unterschiedlicher Stärke. MHC-Klasse I-Antigene bezeichnet man auch als ‘Transplantations-Antigene’, da sie eine zelluläre Immunreaktion auslösen, die für die Abstoßung von Transplantaten verantwortlich ist und

im Zusammenhang mit der Transplantation entdeckt wurden. Die MHC-Klasse II-Antigene werden dagegen nicht von allen Körperzellen exprimiert, sondern insbesondere von den Zellen, die bei immunologischen Zell-Zell-Interaktionen den Helfer T-Lymphozyten das Antigen als Komplex mit MHC-Klasse II-Molekülen präsentieren. Antigen-präsentierende Zellen sind Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen.

3.4.2. Subpopulationen von T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten werden unterteilt in zytotoxische T-Zellen und Helfer T-Zellen. Erstere exprimieren CD8 und letztere CD4. Helfer T-Lymphozyten sind die wesentlich positiv regulierenden Zellen bei Immunreaktionen. Suppressor T-Lymphozyten regulieren sie negativ. CD4 T-Zellen werden weiter unterschieden in Helfer T-Lymphozyten des Typs I (T_{H1}) und Helfer T-Lymphozyten des Typs II (T_{H2}), gemäß ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion [105, 106]. Die spezifischen T_{H1} -Zytokinprodukte sind Interleukin 2 (IL2), Interferon gamma ($IFN\gamma$) und Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$). Dagegen gehören Interleukin 4 (IL4), Interleukin 6 (IL6), und Interleukin 10 (IL10) zur Gruppe der T_{H2} -Zytokinprodukte [146, 148].

3.4.3. Effektorzellen und Mechanismen der zellulären Zytotoxizität in pankreatischen Beta-Zellen

Effektorzellen bei zellulären, immunbedingten Zytotoxizitätsreaktionen im Rahmen der Pathogenese des Typ 1 Diabetes sind mit höchster Wahrscheinlichkeit: $CD8^+$ -MHC-Klasse I-restringierte antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten, $CD4^+$ -MHC-Klasse II-restringierte Helfer T-Zellen und antigenunspezifische, nicht MHC-restringierte Makrophagen [60, 155]. Da Beta-Zellen selbst keine MHC-Klasse II-Moleküle exprimieren [7], können sie das Autoantigen nicht direkt den Helfer T-Zellen präsentieren, sondern benötigen dafür Antigen-präsentierende Zellen. Dadurch erkennt der T-Zellrezeptor der Helfer T-Lymphozyten den Komplex von Autoantigen und MHC-Klasse II-Molekülen. Nach ihrer Aktivierung produzieren Helfer T-Lymphozyten eine Reihe von Interleukinen (IL2, $IFN\gamma$), die u. a. Makrophagen zu zytotoxischen Funktionen aktivieren können. In diesem Fall tragen aktivierte Helfer T-Lymphozyten indirekt zu zellulären zytotoxischen T-Zell-Reaktionen bei (Bystander-Effekt). Im Gegensatz dazu verläuft der direkte Mechanismus der immunbedingten selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen durch die zytotoxischen T-Lymphozyten. Der T-

Zellrezeptor der zytotoxischen T-Zellen bindet mithilfe seiner antigenspezifischen Rezeptoren an den MHC-Klasse I-Antigen-Komplex der Beta-Zelle. Die zytoplasmatischen Perforin-Granula der zytotoxischen T-Lymphozyten werden exozytiert und lagern sich in die Membran der Beta-Zelle ein und bewirken so deren Lyse. Weiterhin kann auch die Bindung des Fas-Liganden (Fas-L) der zytotoxischen T-Zellen an den Fas-Rezeptor (FasR) der pankreatischen Beta-Zellen, deren Lyse durch Apoptose bewirken [2, 100, 101, 111, 148]. Die endogenen Signaltransduktionskaskaden, sowohl des direkten als auch des indirekten Mechanismus der Beta-Zell-Zerstörung, führen zur Apoptose und somit zur Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas [100, 77, 148]. Während nicht aktivierte Makrophagen keinerlei zytotoxische Effekte bewirken, können sie durch IFN γ zu durchaus wirksamen zytotoxischen Zellen aktiviert werden. Synergistisch initiieren diese Zelltypen (zytotoxische T-Lymphozyten, Helfer T-Lymphozyten und Makrophagen) eine Kaskade von immunologischen und inflammatorischen Prozessen in den Pankreasinseln, welche zu einer selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen und folglich zur Entstehung eines insulinabhängigen Diabetes mellitus führt [2, 77, 156, 162]. Die genaue Ätiologie der beschriebenen Störungen der zellvermittelten Immunität ist jedoch noch nicht genau aufgeklärt [163].

3.4.4. Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten 'Selbstmord' einer Zelle [61, 86]. Es wird angenommen, dass die Zelle selbst aktiv Prozesse in Gang setzt, die zu ihrem Tod führen. Diesen 'Zelltod' stellt man der Zellnekrose gegenüber, bei der die Zelle platzt und ausfließt, was zu einer Entzündungsreaktion führt [77]. Ist in einer Zelle die Apoptose ausgelöst worden, so wird aus ihren Mitochondrien Zytochrom c freigesetzt. Dieses verbindet sich mit dem Protein Apaf1. Der so entstehende Komplex aktiviert das Caspasesystem, eine Reihe von Proteinen, die für die Zellfunktion essenzielle Proteine zerstören. Außerdem verändert sich die Oberfläche der Zellmembran so, dass die Zelle ohne Sekretion entzündungsfördernder Stoffe phagozytiert wird [77]. Die Apoptose kann über Todesrezeptoren vermittelt werden, wobei eine Wechselwirkung der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie mit der TNF-Ligandenfamilie erfolgt. Die Liganden sind Transmembranproteine des Typs II. Sie bestehen aus einem intrazellulären Anteil und einem extrazellulären Bindungsmotiv. Die zu den Transmembranproteinen des

Typ 1 gehörenden Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Bindungsmotiv und einem intrazellulären Anteil, der bei einigen Rezeptoren, wie z. B. Fas, DR4 und DR5 eine Todesdomäne enthält. Zur Weiterleitung der Signale entsteht eine Trimerbildung der Rezeptoren, wobei diese entweder durch Bindung der trimerisierten Liganden oder durch noch nicht bekannte intrazelluläre Mechanismen induziert wird. Zu diesen beiden Familien gehören TNF α mit den entsprechenden Rezeptoren TNF-R1 (TNF-Rezeptor 1) und TNF-R2 (TNF-Rezeptor 2), Fas-L (Fas-Ligand, andere Bezeichnungen: CD95L oder Apo-1L) mit dem Rezeptor Fas (auch CD95 oder Apo-1) und TRAIL (*(TNF) Related Apoptosis Inducing Ligand*, Apo-2L) und die dazugehörigen Rezeptoren DR4 (*Death Receptor 4*, TRAIL-R1), DR5 (*Death Receptor 5*, TRAIL-R2, TRICK2 oder KILLER), DcR1 (*Decoy Receptor 1*, TRAIL-R3, LIT oder TRID), DcR2 (*Decoy Receptor 2*, TRAIL-4 oder TRUND). Osteoprotegrin (OPG) ist der fünfte TRAIL-Rezeptor, welcher die Osteoklastogenese inhibiert [29]. TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) besitzen eine zytoplasmatische Todesdomäne. TRAIL-R3 und TRAIL-R4 haben verkürzte Todesdomänen und können den NF- κ B Signalweg aktivieren und auf diese Weise Apoptose verhindern. Neben diesen physiologischen Signalstoffen können unter anderem Gamma- oder UV-Strahlen Apoptose induzieren. Chemotherapeutika, freie Radikale und Wasserstoffperoxid, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA können ebenfalls apoptotischen Zelltod auslösen. So werden beispielsweise zunächst Proteine gespalten, die die Kernmembran stützen (Laminine), wodurch die DNA freigelegt wird; diese wird darauf durch ebenfalls proteolytisch freigesetzte Nukleasen zerlegt [23]. Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen der Zelle bleiben intakt, und der Stoffwechsel läuft über einen langen Zeitraum normal weiter. Der Zellkern beginnt zu schrumpfen, und das Chromatin verdichtet sich. Eine intensive Bildung von Ausstülpungen und Bläschen ist an der Zytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel – die sogenannten apoptotischen Körperchen – von der Zelle abzuschneiden. *In vivo* werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. *In vitro* kann man zu einem sehr späten Zeitpunkt die Lyse apoptotischer Körperchen beobachten. Biochemisch kommt es aber bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. So wird in der Membran Phosphatidylserin, das normalerweise ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert. Im Zellkern werden

spezifische kalzium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert, welche die genomische DNA in Bruchstücke zerschneiden. Zahlreiche Studien belegen, dass Apoptose zum Beta-Zelltod bei autoimmunem Diabetes beiträgt [41]. In diesem Prozess wirken Zytokine (IL1 β , TNF α , IFN γ) als Mediatoren, welche die Bildung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen anregen, die toxisch für die Beta-Zellen sind [30, 61, 107, 111]. IFN γ ist ein Homodimer von 20–25 kDa und 143 Aminosäuren Länge. Für das murine IFN γ kodiert ein 6 kb großes, 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 10 der Maus. Gebildet wird IFN γ u. a. von T_{H1}-Zellen, NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen. Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, das *in vitro* und *in vivo* antivirale und antitumorizide Wirkung zeigt und mononukleäre Phagozyten zur Phagozytose von tumor- und virusinfizierten Zellen aktiviert. Außerdem erhöht IFN γ die MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II Expression auf Zellen des Immunsystems und deren Zielzellen im Gewebe. Die IFN γ Produktion der T_{H1}-Zellen wird durch das von Makrophagen und B-Lymphozyten gebildete Zytokin IL12 induziert [48, 102]. TNF α ist ein Protein von 17 kDa und 156 Aminosäuren Länge. Ein 3,6 kb großes, 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 17 der Maus kodiert für das TNF α . Produziert wird TNF α u. a. von Makrophagen, NK-Zellen und T_{H1}-Zellen. TNF α ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches die Phagozytose von Makrophagen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen stimuliert. Des Weiteren ist TNF α an der Proliferation von B-Lymphozyten und T_{H1}-Zellen beteiligt, wo es seine eigene Synthese autokatalytisch regulieren kann [59]. Das Protein *Pancreatic Derived Factor* (PANDER, FAM3B) ist ein neu identifiziertes Zytokin [23], das in den Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas exprimiert wird. Cao und Mitarbeiter [23] demonstrierten die apoptotische Wirkung dieses Zytokins in insulinsezernierenden Zellen (Zelllinie: Beta-TC-3, Spezies Maus). Das mitochondriale Enzym Mangansuperoxiddismutase (Mn-SOD) ist ein wirkungsvolles Antioxidans. Durch seinen protektiven Effekt schützt es Beta-Zellen des endokrinen Pankreas vor Oxidationsschäden [28]. Die Regulation der Mn-SOD Expression ist bisher noch ungeklärt. Es wird diskutiert, dass die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in der transkriptionellen Regulation dieses Antioxidans involviert sind. Die Arbeitsgruppe von Eizirik [28] konnte zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B notwendig ist für die Zytokin-induzierte Expression der Mn-SOD mRNA in insulinproduzierenden Zellen (Zelllinie: RINm5F, Spezies Ratte). Untersuchungen an diabetischen NOD-Mäusen haben gezeigt, dass die gezielte Geninaktivierung von TRAIL

eine Expansion der autoreaktiven T-Zellen mit sich bringt; somit lässt sich schlussfolgern, dass durch die Expression von TRAIL die Entwicklung diabetogener T-Zellen ausbleibt [78].

3.4.5. Beta-Zell-Autoantigene

Die humorale Immunreaktion ist durch die Synthese und Sekretion von Antikörpern (Immunglobulinen) gekennzeichnet. Antikörper werden nur von B-Lymphozyten/Plasmazellen hergestellt. In seiner Grundstruktur ist ein Antikörper ein tetrameres Molekül aus jeweils zwei leichten (L) und zwei schweren-(H)-Ketten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Die Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die zur Bildung von Antikörpern führen, ist von einer Antigenpräsentation (z. B. durch Makrophagen), in der Regel in Anwesenheit von Helfer T-Lymphozyten, abhängig. Die beiden Antigen-Bindungsstellen des Antikörpers, die jeweils nur für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind, binden das dazu passende Antigen. Der Antigen-aktivierte B-Lymphozyt erhält von einem Helfer T-Lymphozyten die für die Proliferation notwendigen Interleukine. Nach Differenzierung zur Plasmazelle endet die Proliferation des B-Lymphozyten, und die Zellen produzieren große Mengen an Immunglobulinen ihrer jeweiligen Spezifität. Bestimmten Subgruppen von Antikörpern ist es möglich, durch direkte Aktivierung von Komplementfaktoren die mit dem Antigen verbundene Zelle zu schädigen. Andere Antikörper 'opsonisieren' die gebundene Zelle zur Phagozytose durch Makrophagen. Somit wird deutlich, dass die humorale Immunität vielmehr eine wichtige Markerfunktion für das Autoimmungeschehen des Typ 1 Diabetes erfüllt [7], als eine Funktion in der Ätiologie der Insulitis, wie sie bei der zellulären Immunität (T-Lymphozyten) zu erkennen ist. Es finden sich im Blut von Typ 1 Diabetikern im Vergleich zu gesunden Personen vermehrt charakteristische Autoantikörper, die gegen Bestandteile der pankreatischen Beta-Zelle gerichtet sind [7, 67, 70, 87, 97, 99, 146]. In Tabelle 1 sind Autoantikörper zusammengefasst, die bei Patienten mit Diabetes Typ 1 gefunden wurden.

Tabelle 1: Klinisch relevante Autoantikörper bei Typ 1 Diabetikern [7].

Autoantikörper	Prävalenz
Glutamatdecarboxylase	70–80 %
Insulin	20–30 %
Inselzellproteine	70–80 %
Tyrosin-Phosphatase	30–50 %

Neben dem Insulin selbst, diversen Inselzellproteinen und der Tyrosin-Phosphatase stellt die Glutamatdecarboxylase wohl eines der wichtigsten Autoantigene dar [13, 16, 106]. Die Arbeitsgruppe von Baekkeskov identifizierte im Jahr 1990 das Antigen Glutamatdecarboxylase [137]. In Neuronen des Zentralnervensystems katalysiert dieses Enzym die Umwandlung von Glutamat in den Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) [12, 35, 80, 146]. Glutamatdecarboxylase kommt beim Menschen in mindestens zwei Isoformen vor, die durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden: GAD65 (GAD2) mit einem Molekulargewicht von 65.000 Da ist auf Chromosom 10 kodiert, GAD67 (GAD1) mit einem Molekulargewicht von 67.000 Da auf Chromosom 2 [35, 45, 102, 106, 145]. GAD wird außer in Neuronen auch in Beta-Zellen und Geschlechtsorganen exprimiert [70]. Während in Neuronen beide Isoformen vorkommen, findet sich in den Inselzellen des humanen Pankreas nur GAD65. Hingegen dominiert die GAD67 Isoform in primären Beta-Zellen der Maus, die GAD65 Isoform der Ratte überwiegend in primären Beta-Zellen der Ratte [70, 74, 136, 155]. Beide Isoformen sind im Zytoplasma der pankreatischen Beta-Zelle lokalisiert. Die zwei Formen unterscheiden sich in ihrer Assoziation mit Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) [69, 136, 142]. An GAD67 ist dieses Coenzym mehr gebunden als an GAD65 [136, 158]. Beide Isoformen weisen eine 80 %ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf [142]. Untersuchungen haben belegt, dass das GAD65 Protein aus den Spezies Mensch und Ratte sowohl in membrangebundener, als auch in löslicher Struktur vorliegen kann; es besitzt amphiphile Eigenschaften. Im Gegensatz dazu weist das GAD67 Protein hydrophile Merkmale auf [26, 74, 91, 159]. Studien von Asada [3, 4] haben gezeigt, dass durch die gezielte Geninaktivierung von GAD67 in Mäusen diese nach der Geburt an respiratorischen Komplikationen sterben; hingegen überleben GAD65-*knock-out*-Mäuse, sind aber epileptisch und schizophran. Weiterhin wurde belegt, dass Autoantikörper gegen GAD65

bereits Monate bis Jahre vor der klinischen Manifestation eines Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden können [90, 137]. Somit sind GAD65 Antikörper Marker des Autoimmungeschehens in der prädiabetischen Phase [35, 69, 74, 137]. Daneben findet man Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase auch bei neurologischen Erkrankungen wie dem Stiffman-Syndrom [35]. Die Arbeitsgruppe von Yoon [163] konnte in einem transgenen Ansatz zeigen, dass in der NOD-Maus die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes durch Suppression der Expression beider GAD Isoformen verhindert werden kann. Durch Konstruktion eines GAD antisense Transgens und Überexpression dieses Konstrukts in insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas konnte die Expression beider GAD Isoformen in der NOD-Maus wirkungsvoll unterdrückt werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass durch die komplette Suppression der GAD Expression in der NOD-Maus die Bildung diabetogener T-Zellen (CD4 und CD8) ausbleibt. Diese Befunde zeigen, dass die Beta-Zell-spezifische Expression des Enzyms Glutamatdecarboxylase notwendig ist für die Entwicklung eines autoimmunbedingten Typ 1 Diabetes. Nach übereinstimmender Ansicht stellt die Glutamatdecarboxylase eines der primären 'Zielantigene' bei der Entstehung des insulinabhängigen Diabetes mellitus dar [151].

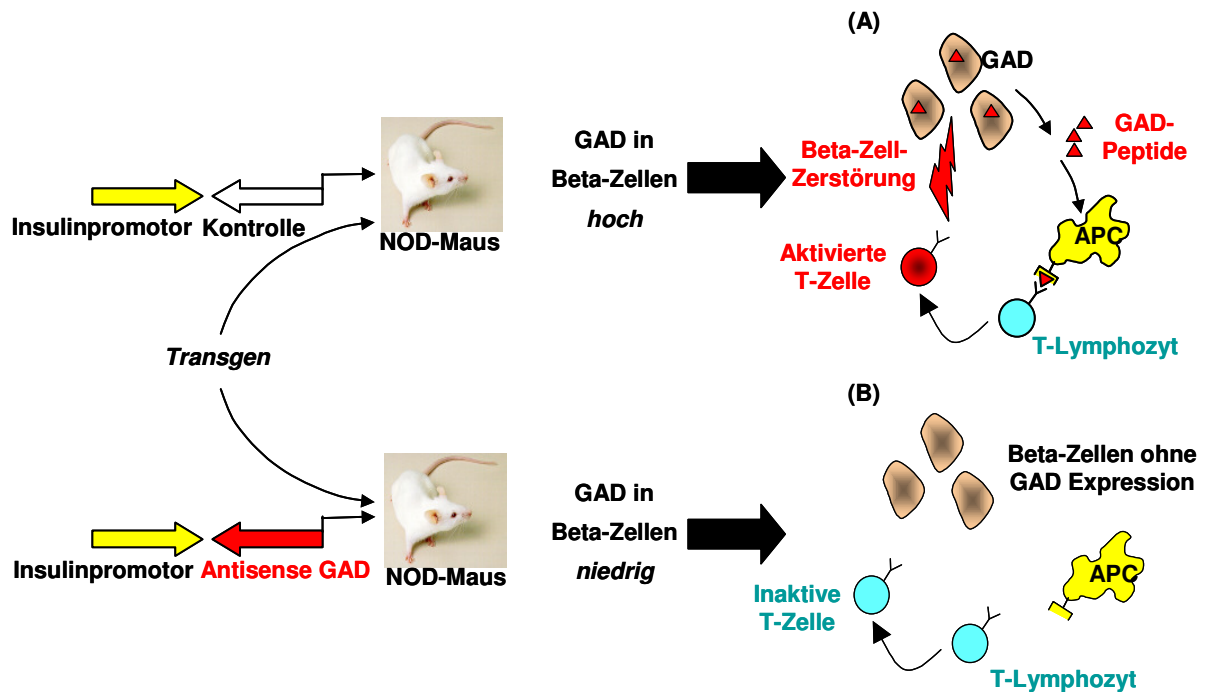


Abbildung 2: Modell der T-Zellaktivierung durch die Expression der Glutamatdecarboxylase (GAD) in insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas im Rahmen der Immunpathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. (A) Antigene Peptidepitope der GAD werden durch lokale Antigen-präsentierende Zellen (engl. *Antigen Presenting Cell*, APC) HLA-vermittelt präsentiert. Dies führt über die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes durch T-Zellrezeptoren zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, welche die immunologische Zerstörung der Beta-Zellen vorantreiben. (B) Wird die GAD Expression verringert oder gänzlich supprimiert, so wird die T-Zellaktivierung durch dieses Autoantigen verhindert und die GAD negativen Beta-Zellen sind vor der Immundestruktion geschützt (modifiziert nach [163]).

3.4.6. Experimentelle Modelle des Typ 1 Diabetes

Zur wissenschaftlichen Betrachtung des Typ 1 Diabetes beim Menschen eignen sich Tiermodelle mit spontanem Diabetes, wie die bereits erwähnten Mäuse/Ratten, in denen mittels der diabetogenen Zellgifte Streptozotocin und Alloxan ein Diabetes medikamentös induziert wird [140]. Durch diese Substanzen wird eine irreversible Schädigung der insulinproduzierenden Zellen erreicht [49, 82]. Anzumerken ist, dass das NOD-Mausmodell und das BB-Rattenmodell [8, 9, 52, 70, 72, 151, 162, 163] zwar spontan Diabetes mellitus entwickeln, der zwar ähnlich, aber nicht identisch mit dem Typ 1 Diabetes beim Menschen ist [100].

3.5. Therapieformen des Diabetes mellitus

In den letzten Jahren wird nach Möglichkeiten geforscht, um eine Insulinproduktion von Inselzellen beim Diabetes mellitus Typ 1 herzustellen. Um eine effektive Therapie durchzuführen, bedarf es vor allem der Mitarbeit des Patienten. Nur so kann eine normoglykämische Stoffwechseleinstellung, das Erreichen optimaler Lebensqualität und die Vermeidung akuter und chronischer Komplikationen erreicht werden. Grundlage der Therapie ist stets die Substitution des fehlenden Insulins. Weitere Therapieansätze werden in der Transplantationsmedizin gesucht.

3.5.1. Medikamentöse Therapie

Diabetes mellitus Typ 1 gilt als organspezifische Autoimmunerkrankung der insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas. Der daraus resultierende Insulinmangel bedingt eine krankhafte Erhöhung des Blutzuckerspiegels, der sich durch konsequente Insulintherapie normalisieren lässt. In der Regel kommen heute fast nur noch gentechnisch hergestellte Humaninsulinpräparate zur Anwendung. Daneben verwendet man auch künstlich hergestellte Insulinanaloga. Im Gegensatz dazu war früher tierisches Insulin vom Rind oder Schwein weit verbreitet. Mit dieser Behandlungsmöglichkeit haben die meisten Diabetiker eine nahezu normale Lebenserwartung. Allerdings ist die Regelung der Blutzuckerkonzentration durch die Verabreichung von Insulin bei weitem nicht so genau wie die körpereigene Regelung bei einem gesunden Menschen. Dies kann langfristig zu gefürchteten Spätschäden wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Nierenversagen mit anschließender Dialyse, Sehstörungen mit der Gefahr der Erblindung und Nervenschäden führen [25, 118]. Eine weitere Therapieoption ist das inhalative Insulin [19]. Bei der

Darreichungsform handelt es sich um ein Insulintrockenpulver, das vor den Mahlzeiten mit Hilfe eines Inhalators eingenommen wird; durch die Aufnahme über die Lunge erhöht es bei schneller Resorptionszeit den Insulinspiegel kurzfristig. Den Patienten bleibt zwar das Spritzen des Insulins erspart, jedoch nicht das Stechen zur Blutzuckermessung. Das Pharmaunternehmen Pfizer stellt weltweit die Produktion des inhalativen Insulins Exubera™ ein; angeblich weil zu wenige Patienten das inhalierbare Insulin anwenden.

3.5.2. Zelltherapie einschließlich Inselzelltransplantation

Neben der Therapie mit Insulininjektionen besteht die Möglichkeit, den Diabetes entweder mittels einer Transplantation der gesamten Bauchspeicheldrüse (Pankreastransplantation) oder der isolierten insulinproduzierenden Zellen (Inselzelltransplantation) zu behandeln [24, 113, 116, 123]. Diesen beiden prinzipiellen Behandlungsmöglichkeiten steht jedoch ein Mangel an Spenderorganen gegenüber [10, 24, 83]. Hinzu kommt die Gefahr der Abstoßung des Spenderorgans durch den Empfänger, die eine Immunsuppression erforderlich macht [24, 83, 88, 103, 112, 120]. Die Abstoßungsreaktion beim nativen Empfänger entspricht dem Erstkontakt des Immunsystems mit einem ihm histoinkompatiblen Gewebe. Im Organismus des Empfängers läuft eine Kaskade der Erkennung von Fremdanigenen und Bildung der entsprechenden Antikörper ab. In dieser Situation befinden sich organtransplantierte Patienten, die vorher nie in Kontakt mit den Antigenen gekommen sind, die sich auf dem Transplantat befinden. Um einer Abstoßung des Transplantats entgegenzuwirken und einen erneuten Autoimmunprozess, der die Beta-Zellen zerstört, zu verhindern, müssen die Patienten Immunsuppressiva einnehmen [153]. Bei vorsensibilisierten Empfängern trifft das Transplantat auf ein Immunsystem, in welchem bereits schon vorher Abstoßungsreaktionen gegen spezifische Oberflächenantigene des Transplantats abgelaufen sind. Weltweit sind nach Aussagen des *International Pancreas Transplant Registry* [63] Ende 2004 fast 23.000 Pankreastransplantationen durchgeführt worden. Die Mehrheit der Pankreastransplantationen wird in Kombination mit einer Nierentransplantation durchgeführt. Ist die Niere durch die Diabetesfolgen schon stark geschädigt, stellt eine Nierentransplantation oft die einzige Lösung dar. Die Inselzelltransplantation ist eine interessante Alternative, da im Gegensatz zur Pankreastransplantation nur ein relativ kleiner Eingriff nötig ist [109]. Hierbei werden die Inselzellen unter lokaler Betäubung in die Leber gespritzt. Doch auch bei der Inselzelltransplantation ist die Einnahme von

Immunsuppressiva erforderlich, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Die ideale Therapie eines Typ 1 Diabetes wäre die Vermeidung der Autoimmunerkrankung. Leider haben jahrelange Forschungen auf diesem Gebiet bis heute zu keinem klinisch verwertbaren Ergebnis geführt. Eine weitere Therapieform, die zur Zeit weltweit experimentell und präklinisch untersucht wird, ist die Züchtung funktionsfähiger Beta-Zellen oder Inseln aus adulten und embryonalen Stammzellen, wie sie in Deutschland an der Universitätsklinik in Giessen durchgeführt wird. Zwar gibt es erste vielversprechende Ergebnisse im Tiermodell, aber von der klinischen Anwendung ist diese Therapieform weit entfernt. Die Genterapie stellt eine weitere Alternative zur Insulinproduktion dar. Die Arbeitsgruppe von Dr. Kieffer von der University of Alberta in Kanada konnte im Tiermodell zeigen, dass durch einen genterapeutischen Ansatz im Darm eine Insulinsekretion erreicht werden kann, welche sich nicht von der endogenen Insulinsekretion aus dem Pankreas unterscheidet [25]. Tierexperimentell konnten Hepatozyten durch gentechnische Transfektion mit dem Insulin/Proinsulingen zur Insulinsekretion angeregt werden [21, 79]. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten als kurativer Therapieansatz bei Patienten mit Diabetes Typ 1 dienen, um eine ausreichende endogene Insulinsekretion zu gewährleisten.

3.6. Immunprotektion von Beta-Zellen bei Typ 1 Diabetes

Die beiden heute nach wie vor nur unzureichend gelösten Probleme im Rahmen der Pankreastransplantation und Inselzelltransplantation sind die sichere Prävention und die rechtzeitige Diagnose der beginnenden Abstoßungsreaktion und damit des Transplantatverlustes. Die rechtzeitige Diagnose der beginnenden Abstoßung kann nicht sicher über die klassischen Parameter der Beta-Zell-Funktion (Blutglukosespiegel und C-Peptid/Insulinspiegel) gestellt werden. Bei auftretender Hyperglykämie ist es meist zu spät, um eine Abstoßung zu verhindern. Zur Zeit kommt es nur bei einem geringen Anteil der Patienten nach einer Transplantation ohne zusätzliche Medikation zu einer Normoglykämie [95]. Mit der Optimierung der technischen Inselisolierung, der Implantation größerer Mengen von funktionsfähigen Inselzellen und der Einführung neuer Immunsuppressiva (Daclizumab, ein Anti-IL2 Rezeptor-Antikörper, Sirolimus und Tacrolimus) ist ein erfolgversprechender Schritt in der Inseltransplantation erreicht worden [83].

3.7. Zielsetzung der Arbeit

Das Enzym Glutamatdecarboxylase stellt ein zentrales Autoantigen in der frühen Immunpathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 dar. Erstes Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung von gentechnologischen Verfahren zur Suppression der GAD Expression in insulinproduzierenden Beta-Zellen des endokrinen Pankreas der Ratte. Ansätze, welche auf die Suppression des GAD Autoantigens in insulinproduzierenden Beta-Zellen abzielen, stellen eine essenzielle Grundlage für die Entwicklung von Strategien zur Immunprotektion von transplantierten Beta-Zellen dar. Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht in der Charakterisierung der funktionellen und phänotypischen Zellspezifität von GAD-supprimierten pankreatischen Beta-Zellen der Ratte. Dies beinhaltet die Untersuchung der Glukose-induzierten Insulinsekretion, Beta-Zell-spezifischen Genexpression und Zytokin-induzierter Apoptose.

4. Material

4.1. Geräteliste (alphabetisch)

ABI-Sequenzer	
mit Computerdokumentation	Applied Biosystems, Darmstadt
Abzugshaube	Köttermann, Uetze
Apparatur für	
DNA Gel Elektrophorese	Bio Rad, München
Apparatur für	
Protein Gel Elektrophorese	Pharmacia Biotech, Freiburg
Autoklav	Melag, Berlin
Automatische Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Cryo Vials (1,8 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eismaschine	Scotsman, München
Entwicklermaschine	Medigraf, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Geldokumentationssystem	
mit Computer und Printer	Intas, Göttingen
Handstückzähler	Ivo, Villingen-Schwenningen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubator für Bakterienkultur	Memmert, Schwabach
Inkubator für Zellkultur	Heraeus, Hanau
Konische Röhrchen 15 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Konische Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Kunststoff-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Hund, Wetzlar
Magnetrührer	Hartenstein, Würzburg
Mehrkanalpipette	Brand, Wertheim
Mikroliterspritze	Hamilton, Darmstadt
Mikroplatten, 96 Vertiefungen,	
Flachboden	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrowellenofen	Siemens, Nürnberg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen

PCR-Gefäße 0,2 ml	Hartenstein, Würzburg
PCR-Maschine	Applied Biosystems, Darmstadt
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
pH-Meter	Hartenstein, Würzburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand, Wertheim
Platten Photometer	Dynatech, Hamburg
PVDF-Membran	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Applied Biosystems, Darmstadt
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenkassette	Hartenstein, Würzburg
Rundbodenröhrchen, 5 ml,	
Polystyrol	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundbodenröhrchen, 14 ml,	
Polystyrol	Becton Dickinson, Heidelberg
Semi-Dry-Elektroblotter	Peqlab, Erlangen
Schüttelinkubator für	
Bakterienkultur	Bühler, Tübingen
Skalpell	Braun, Melsungen
Speed Vac Lyophilizer	Heto, Allerød, Dänemark
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vibrofix	Janke & Kunkel, Staufen
Waage	Kern, Balingen
Wasserbad-Inkubator	Köttermann, Uetze
Zellkulturplatten (diverse)	Brand, Wertheim, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschalen (diverse)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkultur-Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg
Zentrifugen (diverse)	Hettich, Tuttlingen, Beckman, München, Eppendorf, Hamburg

4.2. Chemikalien, biochemische Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Augsburg
Agarose ('Low Gelling')	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose zur DNA/RNA	
Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Ampizillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
APS	Roth, Karlsruhe
BigDye™ Terminator RR Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Blastizidin	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
BSA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
CAPS	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich, Deisenhofen
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe
DOC	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dox	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EGTA	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol (100 %)	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
G418	Calbiochem, Schwalbach
Glukose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glyzerol	Invitrogen, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
H ₂ O	Delta Select, Pfullingen

IGEPAL	Sigma Aldrich, Deisenhofen
KCl	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofektamin	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge	Merck, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PEG	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma Aldrich, Deisenhofen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Boehringer Mannheim, Mannheim
Protein Assay Reagenz	Bio Rad, München
Restriktionsenzyme (diverse)	Promega, Mannheim New England Biolabs, Schwalbach
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
RPMI 1640	Pan Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 (11,1 mM/l Glukose)	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
S.O.C.	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

Trypton	Difco, Augsburg
TSR	Perkin Elmer, Rodgau
Urea	Calbiochem, Schwalbach
Xylenecyanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Zeozin	Invitrogen, Karlsruhe

4.3. Laborkits

Advantage-GC 2 PCR Kit von Clontech, Heidelberg,
 Advantage-HF PCR Kit von Clontech, Heidelberg,
 Alkaline Phosphatase von Promega, Mannheim,
 DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment von Promega, Mannheim,
 LigaFast™ Rapid DNA Ligation System von Promega, Mannheim,
 Qiaquick Gel Extraction Kit™ von Qiagen, Hilden,
 Rapid Pure Miniprep Kit (RPM)™ von BIO 101, La Jolla, USA,
 Rapid Pure Mini-Monster Prep (RPM 4G)™ von BIO 101, La Jolla, USA,
 SUPER SCRIPT™ II von Invitrogen, Karlsruhe,
 T4-DNA-Ligase von New England Biolabs, Schwalbach,
 T4-DNA-Ligase von Promega, Mannheim,
 TaKaRa Ex Taq™ von Takara, Shiga, Japan,
 TOPO™ TA Cloning Kit von Invitrogen, Karlsruhe,
 TransMessenger Transfection Reagent von Qiagen, Hilden und
 Ultrasensitive Rat Insulin ELISA Merckodia, Uppsala, Schweden.

4.4. Größenstandards

1 kbp DNA Leiter (0,1 µg/µl): Die Fragmentgröße erstreckt sich von 75 bp bis 12.216 bp.
 100 bp DNA Leiter (0,1 µg/µl): Die Fragmentgröße erstreckt sich von 100 bp bis 2.072 bp.
 Prestained Proteinmarker (1 mg/ml): Die Fragmentgröße erstreckt sich von 14,3 kDa bis
 200 kDa. Alle Größenstandards sind Produkte der Firma Invitrogen, Karlsruhe.

4.5. Oligonukleotidprimer

Für die Reverse Transkription werden die genspezifischen Primer vom Hersteller IBA, Göttingen, bezogen, Oligo (dT)₁₂₋₁₈ von Invitrogen, Karlsruhe. Die verwendeten Oligonukleotide für PCR Amplifikationen werden alle von der Firma IBA, Göttingen,

hergestellt. Die Oligonukleotide für die Anwendung der siRNA Technik werden von der Firma IBA, Göttingen, synthetisiert.

4.6. Bakterienstämme

E. coli Laborstämme:

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP 10	F ⁺ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
DH5α	supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	selbst hergestellt

4.7. Antikörper und Zytokine

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Zytokine sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Antikörper und Zytokine.

Antikörperbezeichnung	Spezifität	Quelle
Kaninchen polyklonal	GAD65 von Maus, Ratte, Mensch	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen polyklonal	GAD67 von Maus, Ratte, Mensch	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen polyklonal	GAD65 und GAD67 von Ratte, Mensch	Chemicon, Hofheim
Esel-anti-Kaninchen, HRP konjugiert	Zweitantikörper	Amersham Biosciences, Freiburg
Kaninchen polyklonal	VP16 Domäne von Herpes Simplex Virus	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Maus-anti-FLAG M2 monoklonal	FLAG Fusionsprotein	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Zytokinbezeichnung	Spezies	Quelle
Rekombinantes TNF α	Ratte	PromoCell, Heidelberg
Rekombinantes Il1 β	Ratte	PromoCell, Heidelberg
Rekombinantes IFN γ	Ratte	PromoCell, Heidelberg
Fas-L	Mensch	Prof. Wajant, Würzburg
TRAIL	Mensch	Prof. Wajant, Würzburg

4.8. Expressionsvektoren

Zur Klonierung von PCR-Produkten wird der Vektor pCR 2.1 TOPO (3,9 kb), der Firma Invitrogen, und TOP 10 Bakterien verwendet. Die Arbeitsgruppe von Prof. A. J. Tobin, Department of Physiological Sciences, University of California, Los Angeles, USA, stellte für diese Arbeit die cDNAs für GAD65 und GAD67 jeweils in sense und antisense Orientierung zur Verfügung [44]. Diese cDNAs wurden aus dem Hippocampus der Ratte gewonnen und jeweils getrennt, in der gewünschten Orientierung, in den Vektor pBluescript SK eingefügt. Die Plasmide GAD65 sense und GAD65 antisense haben eine Größe von 5,2 kb. Die Größe der GAD67 sense und GAD67 antisense Plasmide beträgt 6,1 kb. Die Inserts befinden sich innerhalb der *Multiple cloning site* in der EcoRI Schnittstelle. Weiterhin wird aus dieser Arbeitsgruppe die humane cDNA von GAD65 zur Verfügung gestellt. Diese cDNA (2,01 kb) wurde aus dem Hippocampus des Menschen isoliert und in sense Orientierung in den Vektor pBluescript SK, innerhalb der SstI/EcoRI Schnittstelle, eingebracht. Die Größe dieses Plasmides beträgt 4,9 kb. Eine für die β -Lactamase kodierende Region (Amp^R) verleiht den Bakterien, die mit dem Vektor pBluescript SK transformiert werden, Ampizillinresistenz. Der eingesetzte E. coli Stamm

DH5 α dient als Wirtszelle für die Plasmide und weist eine hohe Transformationseffizienz auf. Zur Klonierung der verschiedenen GAD Konstrukte werden folgende Vektoren von Invitrogen bezogen: pcDNA3.1^{+/−} (5,4 kb), pSV40/Zeo (3,4 kb) und pCMV/Bsd (3,6 kb). DH5 α Bakterien werden für die Transformation benutzt. Die Arbeitsgruppe von Prof. H. Bujard, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, stellt für die Klonierungsexperimente die Vektoren pUHD10-3 (3,15 kb) und pUHD-172-1-MIP (4,4 kb) bereit. Zur Transformation dieser Plasmide werden DH5 α Bakterienzellen benötigt. Die Arbeitsgruppe von Prof. F. Boege, Institut für Klinische Biochemie der Universität Düsseldorf, stellt für die Konstruktion des Vektors pUHD-172-1-MIP-SAR (5,2 kb) die cDNA für das SAR-Fragment zur Verfügung. Als Vorlage dient das Plasmid pUHD-172-1-MIP, an dessen NaeI Schnittstelle das SAR-Fragment (850 bp) eingebracht wurde. Zur Transformation dieses Plasmides werden DH5 α Bakterienzellen verwendet.

4.9. Zelllinien

Die COS-7 Zelllinie wird von der ‘American Type Culture Collection’ (ATCC), Manassas, VA, USA, bezogen (ATCC#CRL-1651). Die INS-1 Zelllinie wird freundlicherweise von Prof. C. B. Wollheim, Universitätsklinik Genf, Schweiz, zur Verfügung gestellt. Humane Pankreasinseln werden freundlicherweise von Prof. R. Bretzel, aus dem Inseltransplantationszentrum der Universität Giessen, bezogen.

4.10. Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wird als Lösungsmittel destilliertes Wasser verwendet. Die Lösungen werden autoklaviert oder sterilfiltriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.11. Computersoftware

Für Berechnungen und zum Erstellen von Grafiken werden Excel 97 und Prism 3.0 verwendet. Die Digitalisierung der gelektrophoretischen, aufgetrennten Banden erfolgt über das Computerprogramm Adobe Photoshop, die Auswertung über Scion Image. Die Identität der amplifizierten Genabschnitte wird über DNASTAR mit den bereits etablierten Genabschnitten verglichen.

5. Methoden

Grundlegende molekularbiologische und biochemische Methoden werden nach Protokollen von Sambrook und Fritsch durchgeführt [125]. Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur werden strikt unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Gefäße, Pipettenspitzen und Lösungen werden vor ihrer Verwendung sterilisiert, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder anderen Pilzen auszuschließen.

5.1. Methoden zur Zellkultur

5.1.1. Die insulinsezernierende Zelllinie INS-1

Die Ratteninsulinomzelle INS-1 dient als Modell für primäre Ratteninseln. Das kontinuierliche Wachstum dieser Zelllinie [5] ist abhängig von dem reduzierenden Agens Beta (2)-Mercaptoethanol, welches dem Kulturmedium zugesetzt wird. Außerdem konnte in statischen Inkubationsexperimenten gezeigt werden, dass Glukose die Insulinsekretion dieser Zellen stimuliert [158].

5.1.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit eingesetzte Rattenzelllinie INS-1 (Passage 40–80) wird in RPMI 1640 (11,1 mM/l Glukose) Medium unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) als Monolayer kultiviert. Die Zellen werden zum Ernten/Passagieren mit Trypsin-EDTA für 3 min abgelöst. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer.

•Medium zur Kultivierung von INS-1 Zellen

RPMI 1640, 11,1 mM/l Glukose (500 ml)

10 % hi FBS (50 ml)

1:100 Penizillin/Streptomycin (5 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

50 µM Beta (2)-Mercaptoethanol (0,560 ml)

1 mM Natrium Pyruvat (5,6 ml)

10 mM Hepes Puffer (5,6 ml)

•1 x PBS

ohne Ca²⁺, Mg²⁺ und NaHCO₃

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

5.1.3. Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Anzahl Zellen pro Milliliter Medium wird ein Aliquot des Mediums mit Zellen im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau vermischt. Tote Zellen werden blau angefärbt. In einer Neubauer-Zählkammer lässt sich dann die Anzahl der lebenden Zellen unter dem Mikroskop abzählen und auf das gesamte Medium berechnen. Die Anzahl der ungefärbten Zellen pro 1 mm^2 -Zählquadrat wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit 10^4 multipliziert und liefert somit die Anzahl lebender Zellen pro ml Medium.

Lösungen:

- 0,1 % Trypanblau (w/v) in H_2O

5.1.4. Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion der adhärent wachsenden INS-1 Zelllinie wird Lipofektamin verwendet. Es handelt sich dabei um eine Liposomen-vermittelte Gentransfer-Methode. Die zu transfizierende DNA wird von polykationischen Lipiden umhüllt. Die dabei gebildete komplexe Struktur kann entweder passiv mit der Zellmembran fusionieren oder durch Endozytose in die eukaryotische Zelle aufgenommen werden. In beiden Fällen kommt es zur Freisetzung der Nukleinsäure in das Zytoplasma. In Zellkulturschalen (60 x 15 mm) werden die Zellen in einem Splittverhältnis von 1:8 ausgesät (etwa 80 %ige Konfluenz). Am nächsten Tag werden 2 μg linearisierte DNA mit 8 μl Lipofektamin in 300 μl serumfreien Medium für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Medium wird diese Lösung tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die behandelten Zellen werden für 5 h bei 37°C inkubiert. Das Transfektionsmedium wird anschließend durch Kulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgt die Zugabe des Selektionsantibiotikums (z. B. 0,1 mg/ml G418, 0,05 mg/ml Zeozin). Nach 3 bis 4 Wochen werden die heranwachsenden Einzelklone isoliert.

Lösungen:

- Medium zur Transfektion von INS-1 Zellen

RPMI 1640, 11,1 mM/l Glukose (500 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

- 1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

- Lipofektamin (2 mg/ml)

5.1.5. Die COS-7 Zelllinie

COS-7 Zellen sind klonale Isolate, die von einer transformierten Nierenzelllinie des afrikanischen *green monkey* stammen. Die COS-7 Zellen (Passage 40–80) sind schnell wachsende Zellen und werden unter Standardbedingungen (5 % CO_2 , 37 °C) als Monolayer kultiviert. Aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz werden sie zum Herstellen von Positivkontrollen verwendet.

Lösungen:

•Medium zur Kultivierung von COS-7 Zellen

DMEM (500 ml)

10 % hi FBS (50 ml)

1:100 Penizillin/Streptomycin (5 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

- 1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

5.1.6. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion der adhärent wachsenden COS-7 Zelllinie wird Lipofektamin verwendet. Am Vortag werden die Zellen in einem Splittverhältnis von 1:20 in Zellkulturschalen (60 x 15 mm) ausgesät (etwa 80 %ige Konfluenz). Am nächsten Tag werden 2 µg linearisierte DNA mit 8 µl Lipofektamin in 300 µl serumfreien Medium für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Medium wird diese Lösung tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die behandelten Zellen werden für 5 h bei 37 °C inkubiert. Das Transfektionsmedium wird anschließend durch Kulturmedium ersetzt. 24, 48 und 72 h nach der Transfektion werden Zellextrakte isoliert.

Lösungen:

•Medium zur Transfektion von COS-7 Zellen

DMEM (500 ml)

- 1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

- Lipofektamin (2 mg/ml)

5.1.7. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA

Am Vortag werden INS-1 Zellen in einem Splittverhältnis von 1:10 in Zellkulturschalen (60 x 15 mm) ausgesät (etwa 80 %ige Konfluenz). Die Transfektion von einzelsträngigen sense und antisense RNA Oligonukleotiden sowie doppelsträngiger RNA wird mit dem TransMessenger Transfection Reagent (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Lösungen:

•Medium zur Transfektion von INS-1 Zellen

RPMI 1640, 11,1 mM/l Glukose (500 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

- 1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

- TransMessenger Transfection Reagent

- Einzelsträngiges sense RNA Oligonukleotid

- Einzelsträngiges antisense RNA Oligonukleotid

- Doppelsträngiges RNA Oligonukleotid

- Primersequenzen für Transfektion mit siRNA:

GAD65 sense

5'-GUU CAC GGG CGG CAU CGG ATT-3'

GAD65 antisense

5'-UCC GAU GCC GCC CGU GAA CTT-3'

ds Oligo

(Kombination der Primersequenzen von GAD65 sense und GAD65 antisense)

5.1.8. Aufbewahren von Zellen

Um transfizierte Zellen langfristig zu lagern, werden die Zellen einer konfluente Schale (60 x 15 mm) durch Behandlung mit Trypsin von der Schalenoberfläche gelöst und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein 'Cryo Vial' überführt und zunächst für 3 h bei 4 °C gelagert, 3 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C tiefgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgt bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Lösungen:

•Medium zum Einfrieren von transfizierten INS-1 Zellen

83 % INS-1 Medium

10 % FBS

7 % DMSO

•1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

•1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

5.1.9. Auftauen von Zellen

Um Zellen zu rekultivieren, wird ein eingefrorenes Zell-Aliquot bei 37 °C langsam aufgetaut und in ein mit Kulturmedium vorbereitetes konisches Röhrchen (15 ml) überführt. Die Lösung wird für 2 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in eine mit Kulturmedium vorbereitete Schale gebracht. Nachdem sich die Zellen wieder regenerieren (nach 1–2 Tage) wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um eine Schädigung durch DMSO auszuschließen.

5.1.10. Isolierung der Klone mittels Agarose

Je nach Anzahl der vorhandenen Klone wird zunächst eine 1,5 %ige Lösung aus Agarose ('Low Gelling') und 1 x PBS hergestellt. Nach dem Abkühlen der Lösung gibt man das vorgewärmte Kulturmedium im Verhältnis 1:1 zu. Die Zellkulturschalen werden zuvor mit 1 x PBS gewaschen. Nun folgt die Zugabe der Agarose Lösung (ca. 10 ml pro 100 x 20 mm Schale). Nach beendeter Polymerisation werden die einzelnen Klone mit einer

5 ml Spritze angesaugt und getrennt in eine Vertiefung einer Flachbodenplatte – mit vorgelegtem Kulturmedium – überführt (Zellkulturplatte, 12 Vertiefungen, Flachboden). Nach 48 h erfolgt die Zugabe des Selektionsantibiotikums (z. B. 0,1 mg/ml G418, 0,05 mg/ml Zeozin). Im Abstand von ca. 1 Woche werden die proliferierenden Einzelklone – getrennt – in immer größere Vertiefungen der Flachbodenplatte durch Abtrypsinisieren, überführt. Zum Schluss befindet sich jeder Klon in eine eigene Zellkulturschale und kann weiterbearbeitet werden.

Lösungen:

- 1 x PBS

ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und NaHCO_3

- 1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA-4 Na in HBSS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

- Medium zur Kultivierung von INS-1 Zellen

- 'Low Gelling' Agarose

5.1.11. Inaktivierung von Genen – Das Prinzip der antisense Technik

Die Regulation von Genen ist für die Funktion und Identität einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Bei eukaryoten Organismen ist der erste Schritt der Genexpression die Transkription des Gens in einen komplementären RNA Strang. Nach der Transkription erfolgt noch im Zellkern das Prozessieren der RNA. Nach dem Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, beginnt die Translation. In einem antisense Experiment ligiert man das zu klonierende Gen, in umgekehrter Orientierung ($3' \rightarrow 5'$) in einen entsprechenden Vektor. Die bei der Transkription eines solchen 'Gens' entstandene RNA bezeichnet man als antisense RNA (asRNA). Sie ist invers komplementär zur RNA des normalen Gens. Eine antisense RNA kann die Synthese des zu dem Gen gehörenden Proteins verhindern [80]. Der Mechanismus der antisense Technik ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise kommt es dabei zur Hybridisierung zwischen der normalen und der antisense RNA. Vermutlich wird die Genexpression gehemmt, weil das doppelsträngige RNA-Molekül von zelleigenen Ribonukleasen schnell abgebaut wird, oder die antisense RNA verhindert die Bindung der Ribosomen an den normalen RNA Strang. Die Synthese der antisense RNA ist eine wirksame Methode, um ein einzelnes Gen gezielt zu inaktivieren. Die Expression der antisense mRNA und ihre Auswirkung auf die

Quantität der endogenen mRNA in den Zellen, lässt sich u. a. mit Northernblot, RT-PCR und Westernblot nachweisen.

5.1.12. Spezifische Inhibition von Genen durch RNA-Interferenz

Doppelsträngige RNA ist ein endogener, antiviraler Mechanismus in eukaryoten Organismen, um einzelne Genprodukte zu supprimieren. Von Dill [33] wird postuliert, dass dsRNA beim Eintritt in die Zelle, durch ein RNase III-ähnliches Enzym, genannt DICER, gespalten wird. Die daraus entstehenden Fragmente bezeichnet man als small interfering RNAs (siRNAs) und haben 21 bis 23 Nukleotide. Es folgt die Inkorporierung der siRNAs in einen Proteinkomplex, dem RNAi-induced silencing complex (RISC), welcher die siRNAs zu der 'Ziel mRNA' dirigiert [47, 161]. Durch Sequenz-spezifische Hybridisierung der beiden RNAs wird die Translation endogener mRNA unterbunden. Höchtwahrscheinlich wird die 'Ziel mRNA' durch Endo- und Exonukleasen degradiert. Dementsprechend könnte mit dieser Technik in den Tumorzellen vorhandene Protoonkogene unterdrückt werden. Diese Technik wird in der Zellkultur eingesetzt [42]. Die US-Forscher Andrew Fire und Craig Mello erhielten im Jahr 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Das gab das Karolinska-Institut in Stockholm bekannt [76]. Beide sind Entdecker der RNA-Interferenz.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen

Das Optische System enthält eine Xenon-Lampe als Lichtquelle. Die Messwellenlängen betragen 230, 260, 280, 320, 562 und 595 nm. Die direkte Messung der Nukleinsäurekonzentration (dsDNA, ssDNA, RNA, Oligo) erfolgt bei 260 nm, die der Proteine bei 280 nm. Eine A_{260} -Einheit entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 37 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 30 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngigem Oligonukleotid. Den Quotienten A_{260}/A_{280} bezeichnet man als *Ratio*, er gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure an. Für RNA sollte er bei 2,0 für DNA bei 1,8 und für Oligonukleotide unter 1,8 liegen. Eine Senkung dieser Werte ist auf Verunreinigungen durch Proteine oder organische Lösungsmittel zurückzuführen. Meistens werden 2 μl der Probe eingesetzt und mit 48 μl H_2O in einer Kunststoff-Einmalküvette (Uvette 220 nm–1.600 nm) verdünnt. Als Leerwert dient H_2O .

5.2.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt mit dem Trizol Reagenz der Firma Invitrogen, nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Während des Arbeitens mit RNA sollten Handschuhe getragen werden, und Pipettenspitzen mit einem hydrophoben Filter verwendet werden.

Lösungen:

- Trizol
- Chloroform
- 100 % Isopropanol
- 75 % Ethanol

5.2.3. DNase-Behandlung der RNA

Nach der RNA-Isolierung schließt sich eine DNase-Behandlung der RNA an. Die DNase-Behandlung dient der Zerstörung von DNA in der RNA Probe. Die DNase-Behandlung wird in einem Volumen von 76 µl durchgeführt. Die wassergelöste RNA (Maximalmenge 50 µg) wird mit 10 U DNase I (RNase-frei), 40 U RNase Inhibitor, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,3, 0,5 M KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 M DTT und die entsprechende Menge H₂O für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird für die Extraktion 50 µl Phenol/Chloroform-Gemisch zugegeben. Die sich in der oberen, wäßrigen Phase befindende RNA wird in ein neues Reagiergefäß überführt und durch Zugabe von 5 µl 3 M Na-Acetat und 200 µl 100 % EtOH bei -70 °C für 30 min gefällt. Nach Waschen und Trocknen wird die RNA in 20 µl H₂O aufgenommen und kann im Photometer vermessen werden.

Lösungen:

- RNase Inhibitor (40 U/µl)
- DNase I, RNase-frei (10 U/µl)
- 0,1 M Tris/HCl, pH 8,3
- 0,5 M KCl
- 15 mM MgCl₂
- 0,1 M DTT
- Phenol/Chloroform
- 3 M Natriumacetat
- 100 % Ethanol

- 70 % Ethanol

5.2.4. Reverse Transkription (RT)

Zur Erzeugung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wird Reverse Transkriptase verwendet. Retroviren verwenden dieses Enzym, um bei der Replikation ihres RNA-Genoms ein RNA-DNA-Hybrid zu bilden. An die einzelsträngige RNA kann ein genspezifischer Primer bzw. ein poly(T)-Primer für poly(A)⁺-RNAs binden. Mithilfe von Reversen Transkriptasen, RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, wird unter geeigneten Bedingungen ein komplementärer Einzelstrang synthetisiert. Die Umschreibung einer RNA-Matrize in eine cDNA erfolgt nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll unter Verwendung der angegebenen Puffer. Nach der Reaktion wird die cDNA in eine PCR eingesetzt.

•Primersequenzen für Reverse Transkription:

BGH

5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

GAD67 rv

5'-AGACTGGGTGGCG-3'

pcDNA3.1⁻ rv

5'-AAGCTTGGTACCGAGCTC-3'

SAR rv

5'-GCCCAATACGCAAACCGC-3'

GAD65 rv

5'-TTGGTGAGTTGCT-3'

5.2.5. Amplifikation von DNA mithilfe der PCR

Die Polymerasen-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurde 1984 von Kary Mullis etabliert [92]. Eine DNA-Polymerase synthetisiert anhand einer Nukleinsäure-Matrize den dazu komplementären Gegenstrang. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, eine zu amplifizierende DNA-Matrize, Oligonukleotidprimer, Desoxyribonukleotide und ein geeignetes Puffersystem benötigt. Die Oligonukleotidprimer werden synthetisch hergestellt. Sie sollten ca. 20–30 Basen lang sein und zu einem bestimmten Bereich auf dem plus (+) Strang und minus (–) Strang der Nukleinsäure komplementär sein. Die PCR-Reaktion lässt sich in drei Schritte unterteilen, die 25–45mal

wiederholt werden. Standardmäßig werden in dieser Arbeit, sofern nicht anders beschrieben, jeweils 35 Zyklen verwendet. Als erstes erfolgt eine Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94 °C. Anschließendes Abkühlen auf 50–65 °C ermöglicht die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer mit der komplementären Matrizen-DNA. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet. Die dafür benötigte Annealingtemperatur ist u. a. von der Basenzusammensetzung der Oligonukleotidprimer abhängig. Die Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstranges und damit auch die optimale Anlagerungstemperatur der Oligonukleotidprimer an die DNA lässt sich in erster Näherung aus der Anzahl der Guanin/Cytosin und Adenin/Thymin Basenpaare und ihrer Abfolge vorhersagen. Bei Verwendung von Primerpaaren mit unterschiedlicher Annealingtemperatur wird die niedrigere Temperatur verwendet. Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisiert die DNA-Polymerase von dem 3' terminalen Ende dieser Oligonukleotidprimer ausgehend jeweils in 5'→ 3' Richtung bei 72 °C den komplementären DNA-Gegenstrang. Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen wiederum als Matrizen. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man eine exponentielle Zunahme der DNA. Zwei zusätzliche Reaktionsschritte werden nur einmal durchgeführt: vor Beginn der Zyklen eine vollständige Denaturierung der Nukleinsäure bei 94 °C und zum Schluss einer PCR-Reaktion eine Phase zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen bei 72 °C. Die PCR-Reaktionen werden in einer PCR-Maschine durchgeführt. In der Regel werden Reaktionen von 50 µl Volumen in 0,2 ml Gefäßen durchgeführt. Eine Standardreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

- Matrizen-DNA
- Oligonukleotidprimer
- dNTPs
- PCR-Puffer
- DNA-Polymerase

Die PCR-Reaktionen zur DNA-Amplifikation von 18 S, GAD65, Proinsulin, IDX1 und GLUT2 werden mit dem PCR-Kit der Firma Takara unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Zur Amplifikation von GAD67 DNA wird der HF PCR Kit der Firma Clontech nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll eingesetzt. Die PCR-Reaktionen für Nkx6.1 Glukokinase und humane GAD65 werden mit dem GC2 PCR Kit

der Firma Clontech durchgeführt. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der verwendeten Primerkombinationen, der Sequenzen und der Produktlängen.

Tabelle 3: Eigenschaften der genspezifischen Oligonukleotidprimer und erwarteten PCR-Produkte.

Gen	Primer	Sequenz (5'→3')	PCR-Produktlänge/bp
18 S Genbank Accession Nr.: Y18938	18 S s	TCAAGAACGAAAGTCGGAG GTTCG	462
18 S Genbank Accession Nr.: Y18938	18 S as	TTATTGCTCAATCTCGGGTG GCTG	462
GAD65 Genbank Accession Nr.: M72422	GAD65 s	CAAGTGGAAGCTGAACGGT GTGGAG	478
GAD65 Genbank Accession Nr.: M72422	GAD65 as	TTTGAGAGGCGGCTCATTCT CTCTTCAT	478
GAD67 Genbank Accession Nr.: M76177	GAD67 s	AGGAAAAGGGTATACTCCA AGGATG	355
GAD67 Genbank Accession Nr.: M76177	GAD67 as	CTGTGTAGTTTTTCTCGTCG CTCAGGGC	355
GLUT2 Genbank Accession Nr.: NM012879	GLUT2 s	CACATCCTACTTGGCCTATC TGC	443
GLUT2 Genbank Accession Nr.: NM012879	GLUT2 as	CGCCGCCCGCCTTCTCCAC AA	443
Glukokinase Genbank Accession Nr.: M25807	Gluc s	GCCGAGATGATGAAGCACA AGAACTG	381
Glukokinase Genbank Accession Nr.: M25807	Gluc as	GTCCCCGAAGGCGCCCCAC TCC	381
Nkx6.1 Genbank Accession Nr.: AF004431	Nkx6.1 s	CTTCTGGCCTGGGGTGATGC	285
Nkx6.1 Genbank Accession Nr.: AF004431	Nkx6.1 as	TCGGCTGCGTGCTTCTTTCC	285
Pax4a Genbank Accession Nr.: AF198155	Pax4 s	CTCGAATTGCCAGCTAAA GGAT	590
Pax4a Genbank Accession Nr.: AF198155	Pax4 as	GCACAGCTGACAGAAGGAA GGATT	590
Humane GAD65 Genbank Accession Nr.: XM038552	hGAD65 s	AGACCTGCTGCCGGCGTGG	523
Humane GAD65 Genbank Accession Nr.: XM038552	hGAD65 as	AGCAGCCATTCTTTCTCCT TGAC	523

5.2.6. Positivkontrollen der RT-PCR

Für die Positivkontrollen dienen mehrere konstruierte DNA-Plasmide, auf denen die DNA-Sequenzen aller untersuchten Gene enthalten sind. Diese entstehen, nach Standardmethoden in *E. coli* vervielfältigt, isoliert und geschnitten, als Plasmid-DNA für die Arbeit zur Verfügung und werden mit jeder PCR in einem gesonderten Reagiergefäß in definierter Menge mitamplifiziert. Die Banden der einzelnen Gene der Positivkontrollen befinden sich im Agarosegel auf der gleichen Höhe, wie die der eigentlichen Proben.

5.2.7. Negativkontrollen der RT-PCR

Zum Nachweis von Verunreinigungen mit genomischer DNA werden Negativkontrollen eingeführt. Pro Versuch wird eine Reverse Transkription ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase durchgeführt; diese Proben dürfen keine Banden liefern.

5.2.8. Interne Kontrollen der RT-PCR

Zur Kontrolle der Nukleinsäureextraktion und PCR Amplifikation empfiehlt es sich, interne Standards mit konstitutiven Genen einzusetzen. Es gibt eine Reihe konstitutiv, exprimierter, proteincodierender Gene, welche vom Zelltyp und in jedem Zellstadium exprimiert werden. Häufig verwendete Gene als interne Kontrolle sind GAPDH, Beta-Aktin, Ubiquitin C, 2-Mikroglobulin und 18 S rRNA. Das Ribosom der Eukaryoten hat eine Größe von 80 S. Es besteht aus einer großen (60 S) und aus einer kleinen (40 S) Untereinheit. Die große Untereinheit hat drei Arten von ribosomaler RNA (rRNA): 5 S, 28 S und 5,8 S. Die kleine Untereinheit enthält jeweils nur eine kleine rRNA, nämlich 18 S, die als konstitutives Gen bei der PCR Amplifikation als interne Referenz dient.

5.2.9. Agarosegelelektrophorese

Diese Standardmethode ist zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld geeignet. Agarose, ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, ist ein lineares Polymer, welches hauptsächlich aus Galaktose besteht. Es wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei bilden sich aus dem Polyssacharid-Sol Doppelhelizes aus, die sich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Durch die Poren des Gels wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung (Phosphatgruppen), im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe und Konformation der Nukleinsäuren. Zur Auftrennung von großen Fragmenten werden

Gele mit niedriger Agarose Konzentration verwendet. Für die Auftrennung von niedermolekularen Fragmenten werden Gele höherer Agarose Konzentration eingesetzt. Die Dauer der Gelelektrophorese ist abhängig von der verwendeten Gelkammer. In der Regel werden 100 bis 150 Volt Spannung angelegt. Die Stromstärke liegt meist unter 100 mA. Zur Herstellung eines horizontalen Gels werden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente Agarose Konzentrationen zwischen 1 % und 2 % eingesetzt und mit der jeweiligen Menge 1 x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wird der Lösung 10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt. Nach kurzem Abkühlen gießt man die Lösung luftblasenfrei in einen horizontalen Elektrophoresegelträger und setzt den Gelkamm ein. Sobald das Agarosegel bei Raumtemperatur polymerisiert, entfernt man den Kamm und setzt das Gel in eine Elektrophoresekammer, welche mit Laufpuffer (1 x TAE) bedeckt ist. Neben dem Größenstandardmarker trägt man die DNA-Proben im Verhältnis 10:1 mit Probenpuffer versetzt, kurz zentrifugiert, in die Geltaschen. Nach Beendigung des Laufs wird die Auftrennung mit einem UV-Illuminator bei 254 nm kontrolliert und mit einer Sofortbildkamera fotografiert und digitalisiert. Die densitrometrische Auswertung der Bilder anhand der Stärke der sichtbaren Banden wird mit dem Computerprogramm 'Scion Image' durchgeführt.

Lösungen:

•10 x DNA-Probenpuffer

30 % Glyzerol (3 ml)

0,1 M EDTA, pH 8 (2 ml)

1 % SDS (1 ml)

0,25 % Bromphenolblau (0,25 mg)

ad 10 ml H₂O

•1 x TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA)

•EtBr (10 mg/ml)

5.2.10. Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzier-PCR gleicht dem der Amplifizierungs-PCR. Für die Sequenzierung von DNA wird der Big Dye Terminator Kit von Applied Biosystems benutzt. 500–1.000 ng DNA-Lösung werden auf Eis mit 1 µl Primer (3 pmol) sowie 4 µl

des Big Dye Reaktions Mix versetzt und folgendes Sequenzierprogramm in einer PCR-Maschine ausgeführt:

1. 94 °C 5 min
2. 96 °C 30 sec
3. 50 °C 15 sec
4. 60 °C 5 min
5. 4 °C ∞

Schritte 2 bis 4 werden 25mal wiederholt. Unter anschließender Verwendung des AutoSeqTMG-50 Protokolls wird die DNA über Säulen aufgereinigt und durch Ethanolfällung konzentriert. Anschließend wird das Pellet in 25 µl TSR (Template Suppression Reagent) gelöst und in die dafür vorgesehenen 0,5 ml Reaktionsgefäße (Sample Tubes) überführt. Nach zweiminütigem Aufkochen bei 94 °C werden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend in den Sequenzer zur Analyse überführt. Die Proben werden im Autosampler des Sequenzers plaziert. Jede Probe steht mittels einer Kapillare mit der positiven Elektrode (Kathode) in Kontakt. Die negative Elektrode (Anode) taucht in einem Puffer ein. Die Glaskapillare ist auf der einen Seite mit einem Polymer gefüllt. Wenn Strom von der Kathode zur Anode fließt, gelangt ein Teil der zu untersuchenden Probe in die Kapillare (Elektroinjektion). Sobald die Nukleotide in das Detektorfeld gelangen, regt ein Laser die fluoreszenzmarkierten ddNTPs an. Diese Signale werden detektiert, von einem Computer gespeichert und ausgewertet.

Lösungen:

- Big Dye Reaktions Mix
- 100 % EtOH
- 3 M Natriumacetat
- 70 % EtOH
- TSR

•Primersequenzen für Sequenzierung:

M13 (Reverse Primer)

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

T7 (Forward Primer)

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

BGH (Reverse Primer)

5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

T3 (Reverse Primer)

5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

5.2.11. DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Typ II-Restriktionsenzyme, die zur Gruppe der Endonukleasen gehören, spalten doppelsträngige-Desoxyribonukleinsäuren durch enzymatische Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Dabei wird kein energiereiches ATP benötigt sondern Mg^{2+} -Ionen als Cofaktoren. Die Effizienz einer Spaltung ist von den Reaktionsbedingungen abhängig. Für jedes zu spaltende Enzym gibt es einen geeigneten Reaktionspuffer sowie auch spezifische Inkubationstemperaturen und -zeiten. Die Restriktionsspaltungen werden in Volumina von 10–100 μ l durchgeführt. Dazu wird die DNA (0,5–20 μ g), eine entsprechende Menge 10 x Puffer, das/die Enzym/e (10–12 U) und H_2O auf Eis gemischt und anschließend bei der für das Enzym optimale Temperatur (meist 37 °C) für 1–3 h inkubiert. Für die Reaktion wird stets der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Reaktionspuffer verwendet. Falls ein und dieselbe DNA mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten werden muss, so kann dies in einem Ansatz erfolgen. Dazu muss ein Puffer gefunden werden, in dem beide Enzyme eine Aktivität von mindestens 50 % besitzen. Ist dies nicht möglich, müssen die zwei Reaktionen nacheinander durchgeführt werden. Die DNA sollte zwischen den Reaktionen gefällt werden, um den Puffer des ersten Enzyms zu entfernen. Nach beendeter Restriktion erfolgt bei Bedarf eine Hitzeinaktivierung des Enzyms im Reaktionsansatz (10 min 70 °C) oder eine Trennung des Restriktionsenzym von der DNA-Lösung durch eine Reinigungsmethode. Der Restriktionsansatz kann im Anschluss daran für Gelelektrophoresen oder Klonierungen verwendet werden.

5.2.12. Glatte und kohäsive Enden

Für Klonierungsexperimente ist es von erheblicher Bedeutung, wie der Schnitt, den eine Restriktionsendonuklease ausführt, im Einzelnen aussieht. Viele Enzyme spalten einfach beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz, sodass glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Zahlreiche Restriktionsendonukleasen schneiden die beiden DNA-Stränge versetzt, sodass die entstehenden DNA-Fragmente an ihren Enden kurze überstehende Einzelstrangabschnitte besitzen. Diese Stücke bezeichnet man als kohäsive oder klebrige Enden (*sticky ends*).

5.2.13. Dephosphorylierung geschnittener DNA

Damit die glatten Enden (*blunt ends*) des linearisierten Vektor-Plasmides, die durch die Restriktion erzeugt werden nicht religieren, ohne dabei ein Insert aufzunehmen, werden sie durch das Enzym alkalische Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Dieses Enzym wird aus *E. coli*, Kälberdarm oder arktischen Kleinkrebsen gewonnen und entfernt die Phosphatgruppe vom 5'-Ende der DNA-Moleküle. Nach beendeter Restriktion wird dem Ansatz 1 U alkalische Phosphatase gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgen nach Angaben des Herstellers.

5.2.14. Aufpolymerisieren von 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen

Bei Restriktionsspaltungen von doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren entstehen oft überhängende 5'-Enden. Durch eine Aufpolymerisierungsreaktion können diese überhängenden 5'-Enden mit einem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt werden. Hierdurch wird die Ligation von DNA-Fragmenten ermöglicht, die durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen glatte Enden erhalten haben. Zu der DNA werden 2 µl 2,5 mM dNTPs, 5 µl 10 x Klenow-Puffer, 1 U Klenow-Fragment (pro µg DNA) gegeben und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich erfolgt die Hitzeinaktivierung des Klenow-Fragments bei 75 °C für 10 min. Der Ansatz kann durch Elution aus einem Agarosegel gereinigt werden.

5.2.15. Elution von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus TAE Agarosegelen wird der QIAquick Gel-Extraction Kit der Firma Qiagen benutzt. Dazu eignen sich 1 %ige Agarosegele. Bei Verwendung von 320 nm UV-Licht werden die entsprechenden DNA-Banden aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die nachfolgenden Schritte erfolgen nach Angaben des Herstellers.

5.2.16. Reinigung und Konzentrierung von DNA

Um DNA von Verunreinigungen mit Proteinen zu befreien, und sie in einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, wird die DNA-haltige Lösung phenolisiert und anschließend gefällt. Dazu wird die DNA-Probe mit 1 Volumeneinheit Phenol/Chloroform-Gemisch versetzt, gevortext und bei 4 °C, 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Dabei kommt es zum

Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Phase vorliegen. Die sich in der oberen, wäßrigen Phase befindende DNA wird in ein neues Reagiergefäß überführt, mit 2,5 Volumeneinheiten 0,6 M LiCl versetzt und bei 0 °C für 30 min gefällt. Die DNA wird anschließend bei 4 °C, 14.000 rpm für 30 min zentrifugiert, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Anschließend wird das DNA-Pellet in adäquater Menge sterilem TE Puffer resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Lösungen:

- Phenol/Chloroform
- 0,6 M LiCl in 100 % EtOH
- 70 % Ethanol
- TE Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH8)

5.2.17. Ligation von DNA-Fragmenten

T4-DNA-Ligasen sind Enzyme, welche aus E. coli Bakterien gewonnen werden, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Die DNA-Ligase hat in den Zellen u. a. die Aufgabe, zwei getrennte, doppelsträngige DNA-Fragmente kovalent zu verknüpfen. Hohe DNA-Konzentrationen (Vektor/Insert Verhältnis 1:1 bis 3:1) und ein kleines Reaktionsvolumen sind günstige Reaktionsbedingungen. DNA-Fragmente mit glatten Enden werden über Nacht bei 16 °C inkubiert, solche mit kohäsiven Enden bei 14 °C. Die Ligation wird in Volumina von 10–20 µl durchgeführt. Zu den beiden verknüpfenden DNA-Molekülen gibt man 1/10 Volumen 10 x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und die entsprechende Menge H₂O. Der Ansatz kann ohne Reinigung in die Transformation eingesetzt werden.

5.2.18. Messung der optischen Dichte von Bakterien

Das Wachstum von Bakterienkulturen wird durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer bei 600 nm verfolgt. Als Referenzwert dient dabei unbeimpftes Medium. Eine OD₆₀₀-Einheit entspricht etwa 2×10^8 Bakterien/ml.

5.2.19. Herstellung von kompetenten E. coli Zellen

100 µl steriles LB-Medium A werden mit 100 µl Übernachtskultur eines E. coli Stammes (DH5α) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

Das Anzuchtgefäß wird für 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 1.500 xg zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird vorsichtig zunächst in 1 ml LB-Medium A resuspendiert und anschließend in 5 ml LB-Medium B aufgenommen. Es erfolgt eine Aliquotierung zu je 100 µl und die Zellen können bei -80 °C gelagert werden.

Lösungen:

•LB-Medium

NaCl (10 g)

Trypton (10 g)

Hefeextrakt (5 g)

ad 1.000 ml H₂O

•LB-Medium A

1 M MgSO₄ (1 ml)

20 % Glukose (1 ml)

LB-Medium (98 ml)

•LB-Medium B

9 mM PEG (3 g)

1 M MgSO₄ (300 µl)

ad 16 ml LB-Medium

ad 25 ml Glyzerol

5.2.20. Transformation durch ‘Hitzeschock’

Die kompetenten Bakterienzellen werden langsam auf Eis aufgetaut und die Ligationsansätze dazupipettiert. Die Mischung wird 30 min auf Eis inkubiert. Der ‘Hitzeschock’ erfolgt für 90 sec bei 42 °C und ermöglicht die Inkorporierung des Plasmides in die Bakterien. Danach stellt man die Proben für 2 min auf Eis und gibt 200 µl SOC Medium hinzu. Der gesamte Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die Expression des Resistenzgens in den Bakterien zu ermöglichen. Durch das Ausplattieren der Ansätze auf dem entsprechenden Selektionsmedium lassen sich Rekombinanten identifizieren. Die LB-Agar-Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Lösungen:

•SOC Medium

•LB-Agar-Platten

5.2.21. Aufbewahren von Bakterien

Mikroorganismen lassen sich für ca. 6 Wochen in Form von Plattenkulturen bei 4 °C aufbewahren. Für eine längere Lagerung werden Glycerolkulturen angelegt. Durch Vortexen mischt man 0,9 ml einer stationären Kultur mit der gleichen Menge an Glycerol Lösung versetzt und lagert diese Glycerolkultur in sog. 'Cryo Vials' anschließend bei -80 °C.

Lösungen:

•Glycerol Lösung zum Aufbewahren von Bakterienkulturen

65 % Glycerol (65 ml)

0,1 M MgSO₄ (10 ml)

25 mM Tris/HCl, pH 8 (2,5 ml)

ad 100 ml H₂O

5.2.22. Anzucht und Kultur von Bakterien

E. coli Stämme (DH5α und TOP10) werden auf LB-Agar-Platten kultiviert. Am Vorabend werden Flüssigkulturen in LB-Medium aus Einzelkolonien angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Transformierte Bakterien mit einer Antibiotika-Resistenzkassette werden auf die gleiche Art kultiviert, nur dass den Medien das entsprechende Antibiotikum zugefügt wird.

Lösungen:

•LB-Medium für Flüssigkulturen

Trypton (10 g)

NaCl (10 g)

Hefeextrakt (5 g)

ad 1.000 ml H₂O

•LB-Medium für Agar-Platten

Trypton (10 g)

NaCl (10 g)

Hefeextrakt (5 g)

Agar (15 g)

ad 1.000 ml H₂O

•Ampizillin (100 µg/ml)

•LB-Medium 'Low Salt' für Flüssigkulturen

Trypton (10 g)

NaCl (5 g)

Hefeextrakt (5 g)

ad 1.000 ml H₂O

•LB-Medium 'Low Salt' für Agar-Platten

Trypton (10 g)

NaCl (5 g)

Hefeextrakt (5 g)

Agar (15 g)

ad 1.000 ml H₂O

•Zeozin (50 µg/ml)

•Blastizidin (50 µg/ml)

5.2.23. Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem Mini- bzw. Maxi-Plasmid-Kit der Firma BIO 101 nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll unter Verwendung der angegebenen Puffer.

Lösungen:

•Selektionsmedium

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Herstellung von Kernextrakten aus Säugerzellen

Alle Arbeiten werden bei 4 °C durchgeführt und alle Lösungen auf 4 °C gekühlt. Die Kern-Puffer A und C werden mit je 1 mM DTT und PMSF versetzt. Zellen in einer Zellkulturschale werden mit 10 ml PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst und in 1 ml PBS überführt. Die Zellen werden für 5 min bei 250 xg abzentrifugiert, und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, die Suspension in ein Reagiergefäß überführt. Die Zellen werden erneut zentrifugiert für 2 min bei 250 xg, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 µl Kern-Puffer A aufgenommen. Man lässt die Zellen für 15 min auf Eis 'anschwellen'. Nach Hinzufügen von 25 µl 1 % IGEPAL werden die Proben für 10 sec gevortext. Durch anschließendes Anzentrifugieren der Kerne für 30 sec bei 12.000 xg, wird der Überstand verworfen und das Kernpellet in 50 µl Kern-

Puffer C aufgenommen und auf einem Schüttler bei 4 °C für 15 min inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren für 10 min bei 12.000 xg wird der Überstand, welcher die nukleären Proteine enthält, in Aliquots von 20 µl bei -80 °C gelagert. Die so gewonnenen Kernextrakte werden für Westernblot eingesetzt.

Lösungen:

•Kern-Puffer A (hypoton)

10 mM HEPES, pH 7,9 (1 ml)

10 mM KCl (1 ml)

0,1 mM EDTA, pH 8 (0,2 ml)

0,1 mM EGTA, pH 8 (0,2 ml)

ad 100 ml H₂O

•Kern-Puffer C (hyperton)

20 mM HEPES, pH 7,9 (2 ml)

0,4 M NaCl (40 ml)

0,1 mM EDTA, pH 8 (2 ml)

0,1 mM EGTA, pH 8 (2 ml)

20 % Glycerin (20 ml)

ad 100 ml H₂O

•1 % IGEPAL (v/v)

•1 mM DTT

•1 mM PMSF

•1 x PBS

ohne Ca²⁺, Mg²⁺ und NaHCO₃

5.3.2. Herstellung von Zellysaten für Westernblot

Nach Absaugen des Kulturmediums werden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 800 µl Lysispuffer II resuspendiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß transferiert. Die Suspension wird 5 min auf Eis inkubiert, anschließend bei 12.000 rpm (4 °C) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Extrakte erfolgt mit der kalorimetrischen Methode von Bradford.

Lösungen:

•Lysispuffer I

0,15 M NaCl (3 ml)

0,02 M Tris/HCl, pH 7,5 (2 ml)

1 mM EDTA (0,2 ml)

1 % IGEPAL (1 ml)

1 % DOC (1 g)

0,1 % SDS (1 ml)

5 mM NaF (12,5 mg)

Protease-Inhibitor (1 Tablette)

ad 100 ml H₂O

•Lysispuffer II

1 mM DTT, 1 mM PMSF in Lysispuffer I

5.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung nach Bradford [17] wird das entsprechende Reagenz von Bio Rad benutzt. Dazu wird die Lösung 1:5 mit H₂O verdünnt, sterilfiltriert und 160 µl davon zu den Proben pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgt bei 650 nm nach sofortiger Zugabe des Reagenz. Zur Eichung dienen dabei standardisierte BSA-Verdünnungen (0 mg/ml, 0,625 mg/ml, 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, und 10 mg/ml). Mithilfe der Eichgeraden kann die Proteinmenge in der Probe bestimmt werden. Alle Proben werden doppelt bestimmt und aus den Messwerten die Mittelwerte gebildet.

Lösungen:

•BSA-Verdünnungen:

0 mg/ml

0,625 mg/ml

1,25 mg/ml

2,5 mg/ml

5 mg/ml

10 mg/ml

•Bradford-Reagenz

5.3.4. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel erfolgt mit einem diskontinuierlichen Puffersystem. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der anlagernden SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, sodass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt zu werden. Die Proteine wandern daher im Gel ausschließlich aufgrund ihrer Größe in Richtung Anode. Im Bereich der Sättigung werden 1,4 g Natriumdodecylsulfat pro 1 g Polypeptid gebunden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Marker). Die Glasplatten für die Gele werden zuvor gründlich mit 100 % EtOH gereinigt und zusammengebaut. Die Trenngellösung wird bis ca. 2,5 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Erreichen der Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol abgesaugt. Danach gießt man die Sammelgellösung bis zum oberen Rand der Glasplatten und setzt die Kämme luftblasenfrei ein. Nach ca. 30 min ist das Sammelgel fest, die Kämme werden vorsichtig rausgezogen und die Probenaschen der Gele werden mit H₂O ausgespült, um Polyacrylamidreste zu entfernen. Die Gele können nun in die Elektrophoresekammer überführt werden. Oberer und unterer Puffertank der Elektrophoreseapparatur werden mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit Laemmlipuffer versetzt, 3 min bei 98 °C denaturiert, kurz zentrifugiert, auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 5 h bei 100 mA pro Gel. Die Elektrophorese wird beendet, kurz nachdem die Bromphenolblau-Front anfängt aus dem Acrylamid in die Puffer zu laufen. Nach dem beendeten Gellauf werden die Proteine auf eine Membran transferiert.

Lösungen:

•Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid (30 %)

Bisacrylamid (0,8 %)

•10 x Tris-Glyzin Puffer

0,25 M Tris-base (120 g)

1,92 M Glyzin (576 g)

ad 4.000 ml H₂O

•10 % SDS

SDS (50 g)

H₂O (500 ml)

•1 x SDS-Laufpuffer

1 x Tris-Glyzin Puffer (100 ml)

0,1 % SDS (10 ml)

ad 1.000 ml H₂O

•Trenngellösung für ein 12 % Acrylamidtrenngel

Acrylamid-Stammlösung (12 ml)

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (7,5 ml)

H₂O (10 ml)

10 % SDS (0,3 ml)

40 % APS (150 µl)

TEMED (10 µl)

•Sammelgellösung für ein 4,5 % Acrylamidsammelgel

Acrylamid-Stammlösung (1,33 ml)

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (2,5 ml)

H₂O (6,1 ml)

10 % SDS (0,1 ml)

40 % APS (50 µl)

TEMED (5 µl)

•2 x Laemmlipuffer

4 % SDS (20 ml)

100 mM Tris/HCl, pH 6,8 (5 ml)

20 % Glyzerin (10 ml)

8 M Urea (24 g)

0,2 % Bromphenolblau (0,08 g)

ad 40 ml H₂O

•100 % Isopropanol

- TEMED
- SDS 10 % (w/v) in H₂O
- APS 40 % (w/v) in H₂O

5.3.5. Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels Westernblot

In einem Westernblot werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert [147]. Die Proteine werden dadurch immobilisiert und gleichzeitig für die nachfolgende Antikörperdetektion besser zugänglich gemacht. Man schneidet vom Polyacrylamidgel das Sammelgel mit einem Skalpell ab. Die Filterpapiere und die PVDF-Membran werden auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Auf die unterste Graphitplatte wird eine Lage aus drei in Anodenpuffer I-getränkten Filterpapieren, sowie eine weitere Lage aus zwei Filterpapieren mit Anodenpuffer II aufgebracht. Darauf wird die PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt. Die PVDF-Membran muss zuerst für 15 sec in 100 % Methanol inkubiert werden, 2 min in H₂O äquilibrieren und mit Anodenpuffer II angefeuchtet werden. Auf die Membran wird nun vorsichtig das Gel aufgebracht. Den Abschluss bilden vier mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Um Luftblasen zu entfernen wird eine Glaspipette mehrmals über den Blot gerollt. Dann wird die obere Graphitplatte aufgelegt und die Proteine werden stromkonstant bei 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche für 2 h auf die Membran übertragen. Zur Entwicklung des Blots mit spezifischen Antikörpern müssen zunächst alle unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt werden. Das Blockieren erfolgt mit 10 % Magermilchpulver in PBST-Puffer bei 4 °C über Nacht. Die Membran wird zweimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen. Der primäre Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:2.000 eingesetzt und für 1–2 h bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wird abgenommen, eingefroren und kann erneut verwendet werden. Die Membran wird anschließend für zweimal 15 min mit PBST-Puffer gewaschen und mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gewaschen (Verdünnung 1:10.000). Nach 1 h bei Raumtemperatur wird dieser Antikörper verworfen. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wird die Membran dreimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen. Die Membran wird bei allen Schritten unter leichtem Schütteln inkubiert.

Lösungen:

•Anodenpuffer I

- 0,3 M Tris-base (36,3 g)
- 20 % Methanol (200 ml)

ad 1.000 ml H₂O

pH 10,4

•Anodenpuffer II

25 mM Tris-base (3,03 g)

20 % Methanol (200 ml)

ad 1.000 ml H₂O

pH 10,4

•Kathodenpuffer

70 mM CAPS (15,5 g)

20 % Methanol (200 ml)

ad 1.000 ml H₂O

pH 10,5

•PBST

137 mM NaCl (8 g)

2,7 mM KCl (0,2 g)

4,3 mM Na₂HPO₄ (1,15 g)

1,4 mM KH₂PO₄ (0,24 g)

0,04 % Tween 20 (0,4 ml)

ad 1.000 ml H₂O

5.3.6. Entwickeln des Immunoblot

Der Blot wird mit dem ECL Kit von Amersham entwickelt. Dazu wird die Membran in einem 1:1 Gemisch der beiden Detektionslösungen (enthalten jeweils H₂O₂ und Luminol) für 1 min geschwenkt, in Frischhaltefolie gewickelt und in einer Exponierkassette fixiert. Die aufgelegten Filme werden nach 30 min entwickelt. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt dabei das Wasserstoffperoxid zu H₂O und O₂⁻ um. Durch das Sauerstoffradikal wird das Luminol oxidiert und es kommt zur Entstehung von blauem Licht. Der in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegte Film wird dadurch geschwärzt und kann in der Entwicklermaschine entwickelt werden.

5.3.7. Anfärben der Membran mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinbanden können auf der PVDF-Membran direkt durch Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Membran 10–15 min in Färbelösung gegeben. Danach wäscht man mit der Entfärbelösung die überschüssige Farbe von der Membran.

Lösungen:

•Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue (0,2 g)

Methanol (50 ml)

ad 100 ml H₂O

•Entfärbelösung

Eisessig (7 ml)

Methanol (45 ml)

ad 100 ml H₂O

5.3.8. Anfärben des Polyacrylamid-Gels mit Coomassie Brilliant Blue

Die Gele werden mit der Coomassie Brilliant Blue Färbelösung für 2–4 h gefärbt und anschließend für 1 h in Entfärbelösung I überführt und so lange in der Entfärbelösung II entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben.

Lösungen:

•Färbelösung

0,025 % Coomassie Brilliant Blue (0,5 g)

40 % Methanol (800 ml)

7 % Eisessig (140 ml)

ad 2 l H₂O

•Entfärbelösung I

50 % Methanol (500 ml)

10 % Eisessig (100 ml)

ad 1 l H₂O

•Entfärbelösung II

5 % Methanol (500 ml)

7 % Eisessig (700 ml)

ad 10 l H₂O

5.3.9. Strippen von Westernblots

Die PVDF-Membranen können mehrmals mit verschiedenen Antikörpern entwickelt werden. Dazu müssen zunächst sowohl die sekundären auch als die primären Antikörper von der Membran entfernt werden. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich. Die Membran wird bei 50 °C für 20–30 min in Stripping-Puffer geschüttelt. Anschließend wird mindestens dreimal mit PBST gewaschen, bis das Beta (2)-Mercaptoethanol gut verdünnt ist. Dann kann der Blot erneut blockiert und mit neuen Antikörpern entwickelt werden.

Lösungen:

•Stripping-Puffer

62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 (6,25 ml)

2 % SDS (20 ml)

100 mM Beta (2)-Mercaptoethanol (0,7 ml)

ad 30 ml H₂O

5.4. Zellbiochemische Untersuchungen

5.4.1. Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay

5 x 10⁴ Zellen werden in einer Zellkulturplatte (96 Vertiefungen, Flachboden) ausgesät und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden für 48 h stimuliert. Am nächsten Tag wird der Überstand verworfen und die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 150 µl Kristallviolettlösung angefärbt. Danach wird die Färbelösung ca. 5 x mit H₂O abgespült und die Zellkulturplatte unter dem Abzug getrocknet. Zur Messung wird das Kristallviolett mit 150 µl Methanol bei Raumtemperatur gelöst. Die Quantifizierung lebender Zellen wird im ELISA Reader bei 550 nm analysiert.

Lösungen:

•Kristallviolettlösung

0,5 % Kristallviolett (36,3 g)

20 % Methanol (200 ml)

ad 500 ml H₂O

•100 % Methanol

Tabelle 4: Konzentrationen und Wirkungsdauer der eingesetzten Stimulanzen.

Substanz	Endkonzentration	Inkubationszeit
CHX	2,5 µg/ml	30 min
Maus-anti-FLAG M2 mAb	1 µg/ml	10 min
Fas-L	200 ng/ml	48 h
TRAIL	200 ng/ml	48 h
rRaTNF α	1 µg/ml	48 h
rRaIl1 β	10 ng/ml	48 h
rRaIFN γ	100 ng/ml	48 h
rRaTNF α +rRaIl1 β	1 µg/ml+10 ng/ml	48 h
rRaTNF α +rRaIFN γ	1 µg/ml+100 ng/ml	48 h
rRaIl1 β +rRaIFN γ	10 ng/ml+100 ng/ml	48 h
(Zyt Mix) rRaTNF α +rRaIl1 β +rRaIFN γ	1 µg/ml+10 ng/ml+100 ng/ml	48 h

Die lösliche Form von Fas-L besitzt jedoch nur eine geringe Zytotoxizität im Vergleich zum membrangebundenen Fas-L. Die Zytotoxizität des Fas-L kann aber durch Quervernetzen mit Antikörpern um ein vielfaches gesteigert werden [128].

5.4.2. Versuche zur Glukose-induzierten Insulinsekretion

Die Insulinsekretion wird während einer statischen Inkubation ermittelt, d. h. die Zellen befinden sich in einem definierten Volumen an Lösung, in welchem sich das sezernierte Insulin ansammelt, bei aufsteigender Glukosekonzentration. Durch diesen Ansatz kann man nur die Gesamtmenge an Insulin, die während des Untersuchungszeitraumes freigesetzt wird, messen. Der zeitliche Verlauf der Insulinsekretion lässt sich mithilfe eines Perfusionsexperiments darstellen, bei dem die Zellen fortlaufend mit frischer Lösung umspült werden.

5.4.2.1. Sezerniertes Insulin im Zellkulturüberstand

Um in den Zellkulturüberstand sezerniertes Insulin mittels ELISA zu bestimmen, wird zum gewünschten Zeitpunkt nach Stimulation, der Zellkulturüberstand abgenommen. Die Versuche zur Glukose-induzierten Insulinsekretion der verschiedenen INS-1 Zelllinien werden in einer Zellkulturplatte (24 Vertiefungen, Flachboden) durchgeführt. Am Vortag sät man die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 aus (etwa 70 %ige Konfluenz). Die Zellen werden über 3 Tage in Kompletmedium mit Zusatz von 5,6 mM/l Glukose bei 37 °C im Brutschrank gehalten. Bevor die Insulinsekretion analysiert wird, erfolgt eine

Inkubation der unterschiedlichen INS-1 Zelllinien für 60 min in Glukose-freiem Medium. Anschließend wäscht man die Zellen einmal mit je 1 ml KRBH-Puffer. Für den folgenden Sekretionsversuch über 60 min bei ansteigenden Glukosekonzentrationen werden die Zellen in 500 µl KRBH-Puffer mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2,25 mM/l, 5,6 mM/l 11,1 mM/l 18 mM/l, 25 mM/l) inkubiert und stimuliert. Nach Beendigung der Inkubation werden je 500 µl Überstand vorsichtig abgenommen. Eventuell darin befindliche Zellen und andere feste Bestandteile werden für 5 min bei 7.500 xg abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reagiergefäß überführt und bis zur quantitativen Bestimmung des Parameters wird das Insulin bei -20 °C gelagert.

Lösungen:

•5,6 mM/l Glukose Medium zum Aussäen von INS-1 Zellen

RPMI 1640 (500 ml)

560 mM Glukose (5 ml)

10 % hi FBS (50 ml)

1:100 Penizillin/Streptomycin (5 ml)

2 mM L-Glutamin (5 ml)

50 µM Beta (2)-Mercaptoethanol (0,560 ml)

1 mM Sodium Pyruvat (5,6 ml)

10 mM Hepes Puffer (5,6 ml)

•Glukose freies Medium zur Vorinkubation von INS-1 Zellen

RPMI 1640 (500 ml)

•KRBH-Puffer:

134 mM NaCl (2,68 ml)

4,7 mM KCl (0,47 ml)

1,2 mM KH₂PO₄ (0,12 ml)

1,2 mM MgSO₄ (0,12 ml)

1 mM CaCl₂ (0,1 ml)

10 mM HEPES (1 ml)

ad 100 ml H₂O

Diese Lösung wird nach Zusatz von 0,5 % BSA auf pH 7,4 eingestellt.

•1 x PBS

ohne Ca²⁺, Mg²⁺ und NaHCO₃

•1 x Trypsin-EDTA

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA·4 Na in HBSS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

- 560 mM/l Glukose

- BSA

Die Untersuchung wird als Vierfachbestimmung durchgeführt.

5.4.2.2. Intrazelluläres Insulin im Zelllysat

Um intrazelluläres Insulin nach Zelllyse mittels ELISA zu bestimmen, wird der Monolayer zunächst zweimal mit vorgewärmten 1 x PBS gewaschen, um eine Beeinträchtigung durch Reste von Kulturüberständen auszuschließen. Zur Lyse werden pro Vertiefung der Flachbodenplatte 500 µl Säure-Ethanol-Gemisch verwendet. Durch 'Abkratzen' mit einem Zellschaber und kräftiges Spülen mit der Pipette werden die Zellen vom Boden der Zellkulturplatte gelöst, bei -80 °C für 30 min tiefgefroren und wieder aufgetaut. Dieser osmotische, mechanische und thermische Stress genügt, um die Zellen zu lysieren. Nicht lösliche Zellfragmente werden für 5 min bei 7.500 xg abzentrifugiert, der zellfreie Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Bis zur Analyse verbleiben die Proben bei -20 °C.

Lösungen:

•Säure-Ethanol-Gemisch

15 mM HCl (0,45 ml)

75 % ETOH (22,6 ml)

ad 30 ml H₂O

Die Untersuchung wird als Vierfachbestimmung durchgeführt.

5.4.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Menge an Insulin wird mittels ELISA bestimmt. Die Durchführung erfolgt nach dem vom Hersteller (Mercoxia) angegebenen Standardprotokoll unter Verwendung der angegebenen Reagenzien. Das Testprinzip beruht auf der Sandwich-Methode. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem Insulinantikörper beschichtet, der gegen eine definierte Bindungsstelle des Insulinantigens gerichtet ist. Die Proben werden auf die beschichtete Platte gegeben und mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Der zweite Antikörper ist gegen den Insulinantikörper gerichtet und ist mit einem Enzym, der Peroxidase verknüpft. Dieses Enzym kann mit hoher Geschwindigkeit ein zugegebenes farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt oder ein nichtfluoreszierendes Substrat zu

einem intensiv fluoreszierenden Produkt umwandeln. Den Antigen-Antikörper-Komplex bezeichnet man als Sandwich-Komplex. Ein nicht gebundener sekundärer Antikörper wird durch Waschen der Platte entfernt. Anschließend wird die Peroxidase-Substrat-Lösung hinzugegeben und die Farbentwicklung nach 30 min gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional zur Insulin Konzentration in den Standards und in den Proben. Anhand einer Kalibrierungskurve von bekannten Ratteninsulinmengen kann die zu bestimmende Insulinmenge errechnet werden. Da der Methode eine Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde liegt, wird nur das Insulin erfasst, das mit dem eingesetzten Antikörper reagiert. Weniger als ein Nanogramm (10^{-9} g) eines Proteins kann man mit einer solchen Methode bestimmen. Die Messung der Extinktionen erfolgt im ELISA Reader bei 450 nm.

5.5. Statistische Analyse

Die Auswertung erfolgt mithilfe des Computer Programmes Excel, welches die Standardabweichung (SD, standard deviation) über folgende Formel berechnet:

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

Die Ergebnisse werden in Mittelwerten \pm SD ausgedrückt.

n repräsentiert die Anzahl der untersuchten Proben.

6. Ergebnisse

Die Versuche zur vorliegenden Arbeit wurden an der glukosesensitiven, pankreatischen Beta-Zelllinie INS-1 [5] demonstriert, welche als Modell für primäre Ratteninseln dient.

6.1. GAD Expression in INS-1 Beta-Zellen

Um die Expression der Gene GAD65 und GAD67 nachzuweisen, werden INS-1 Zellen verwendet. Von diesen Zellen wird die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die beiden GAD Isoformen und 18 S rRNA mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden im Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 3). Die PCR-Produktlängen von 18 S (462 bp) und GAD65 (478 bp) sind sehr ähnlich. Für die Anwendung in der jeweiligen PCR werden 18 S-spezifische Oligonukleotidprimer bzw. GAD65-spezifische Oligonukleotidprimer ausgewählt (s. Tabelle 3).

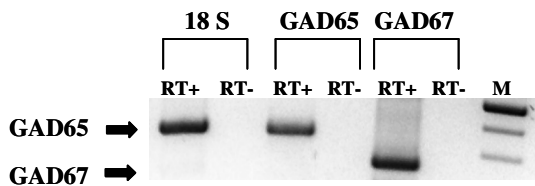


Abbildung 3: Nachweis von GAD65 mRNA und GAD67 mRNA in INS-1 Beta-Zellen.

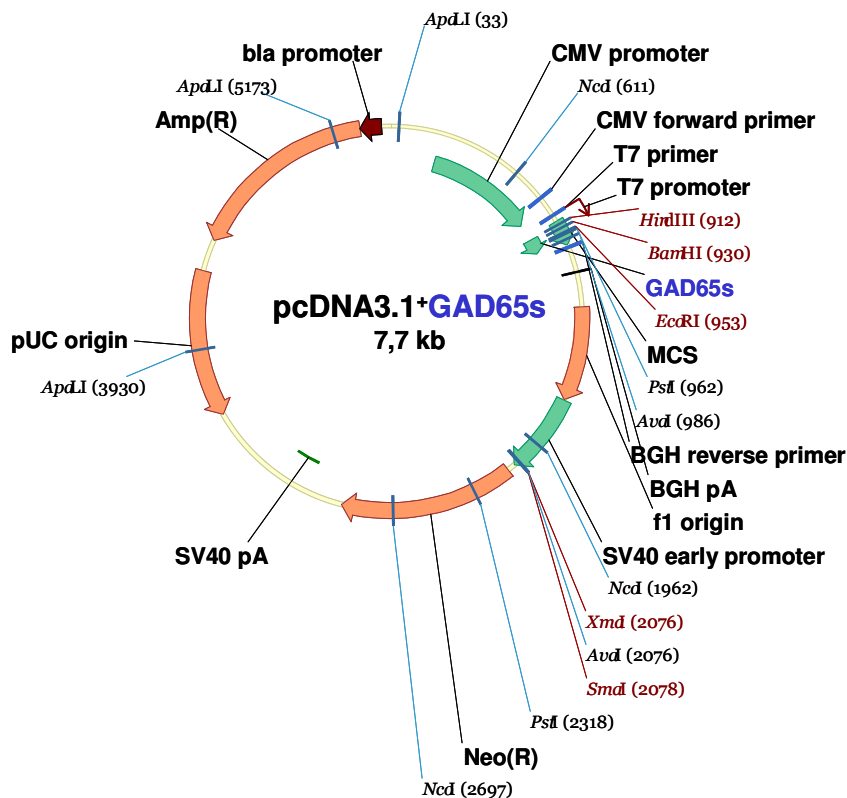
Gesamt-RNA aus INS-1 Zellen wurde isoliert, DNase verdaut und mit einem Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer revers transkribiert. Die PCR-Reaktion für 18 S und GAD65 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 45 sec, 94 °C; Annealing 45 sec, 58 °C; Elongation 1 min, 72 °C. Die PCR-Reaktion für GAD67 besteht aus 30 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 10 sec, 94 °C; Annealing 4 min, 68 °C; Elongation 3 min, 68 °C. 18 S dient als interne Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

6.1.1. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1⁺GAD65 (7,7 kb)

6.1.1.1. Klonierungsstrategie

Zur Verfügung stehen bereits die Plasmide pBluescript SK GAD65 sense und pBluescript SK GAD65 antisense, welche von Dr. Tillakaratne (AG Prof. Tobin) konstruiert wurden. Der Vektor pcDNA3.1⁺ ist ein eukaryoter Expressionsvektor, in den jeweils getrennt GAD65 sense (2,3 kb) und GAD65 antisense (2,3 kb) in die Schnittstellen HindIII und XbaI durch Ligation eingefügt werden. Die Klonierungs- und Sequenzierarbeiten ergeben eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank Accession Nummer: M72422).

A



B

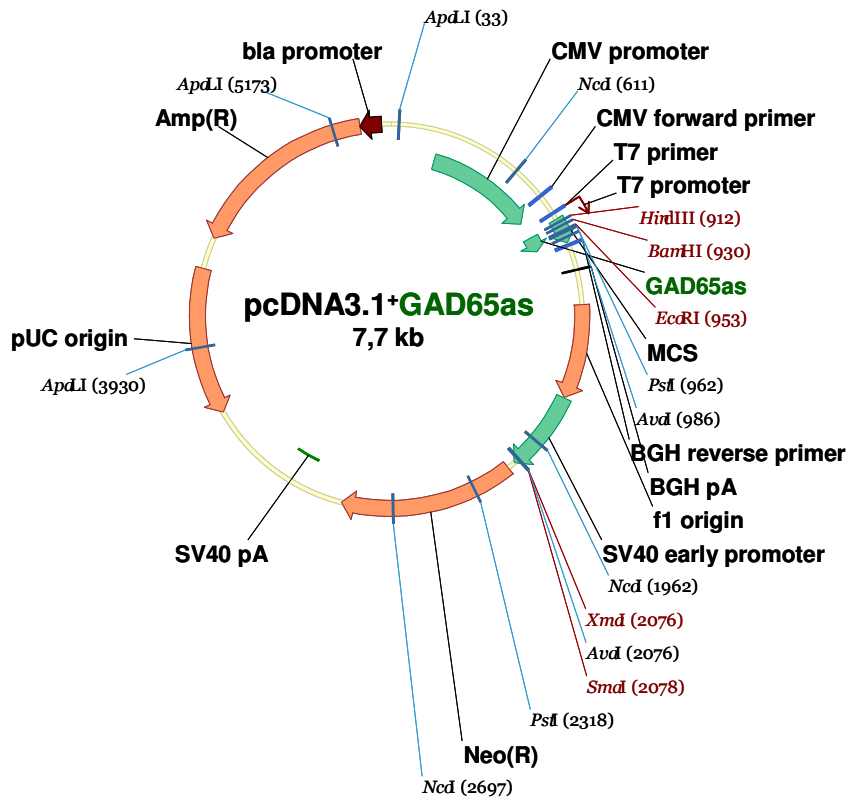


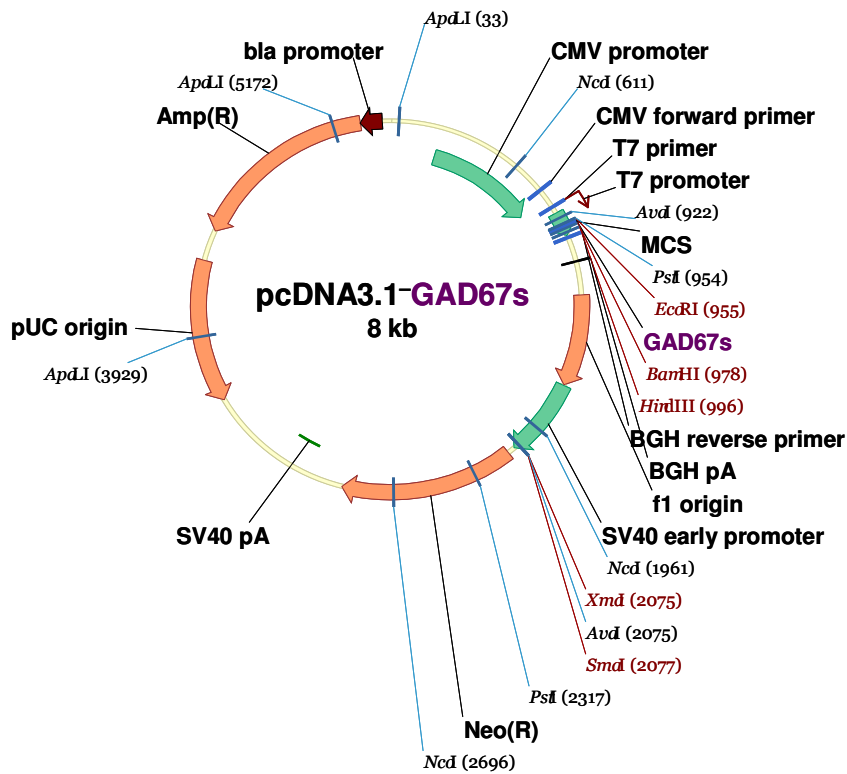
Abbildung 4: Vektorkarte von pcDNA3.1⁺GAD65s (A).
Vektorkarte von pcDNA3.1⁺GAD65as (B).

6.1.2. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1⁻GAD67 (8 kb)

6.1.2.1. Klonierungsstrategie

Die cDNAs für GAD67 sense und GAD67 antisense befinden sich ebenfalls in einem pBluescript SK-Vektor, die von Dr. Tillakaratne (AG Prof. Tobin) bereitgestellt wurden. Der eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1⁻ wird mit EcoRV restringiert. Die 2,6 kb Fragmente des Ratten GAD67 sense und antisense Gens werden jeweils getrennt in den Vektor pcDNA3.1⁻ kloniert und anschließend zur Überprüfung der Sequenz mit den Primern T7 und BGH ansequenziert. Die Sequenzierung ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank Accession Nummer: M76177).

A



B

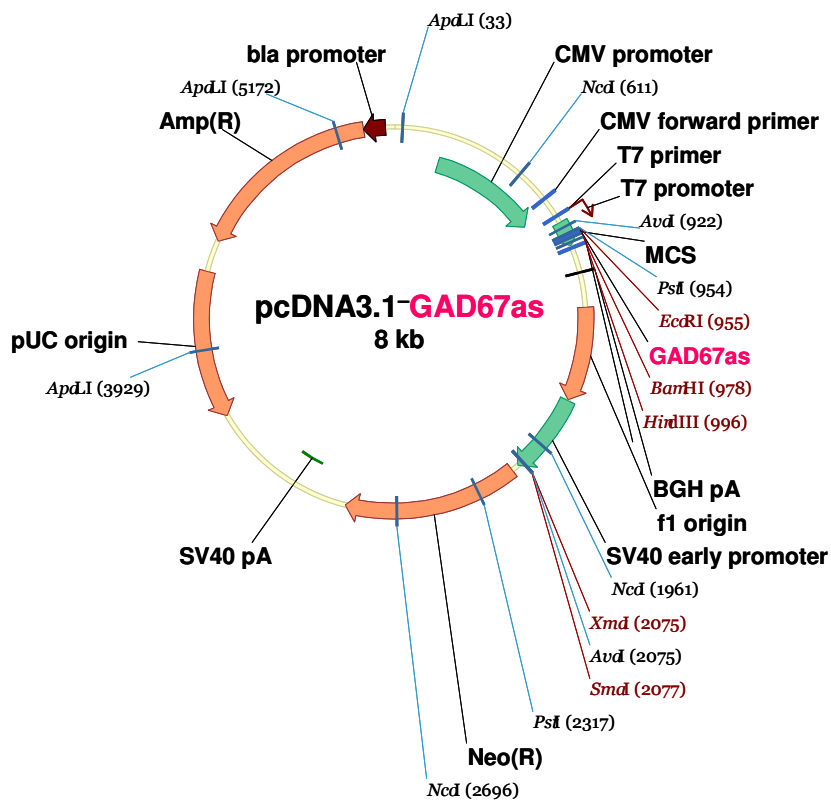


Abbildung 5: Vektorkarte von pcDNA3.1-GAD67s (A).
Vektorkarte von pcDNA3.1-GAD67as (B).

6.1.3. Klonierung des antisense Vektorkonstruktes pcDNA3.1-Zeo GAD67 (9,1 kb)

6.1.3.1. Klonierungsstrategie

Das (End)Konstrukt entsteht durch Umklonierung der Zeozin Resistenzkassette aus dem pSV40/Zeo Vektor (Restriktion mit EcoRV und PvuII) in dem mit Csp45I geöffneten antisense pcDNA3.1-GAD67 Konstrukt. Der Erfolg der Klonierung wird mithilfe einer Restriktionsspaltung überprüft und gibt eine Übereinstimmung der zu erwartenden Fragmente. Der GAD65-supprimierte Zellklon wird mit diesem Vektorkonstrukt stabil transfiziert. Die daraus erhoffte Etablierung eines Zellklons mit gleichzeitiger Suppression von GAD65 und GAD67 war bis zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar.

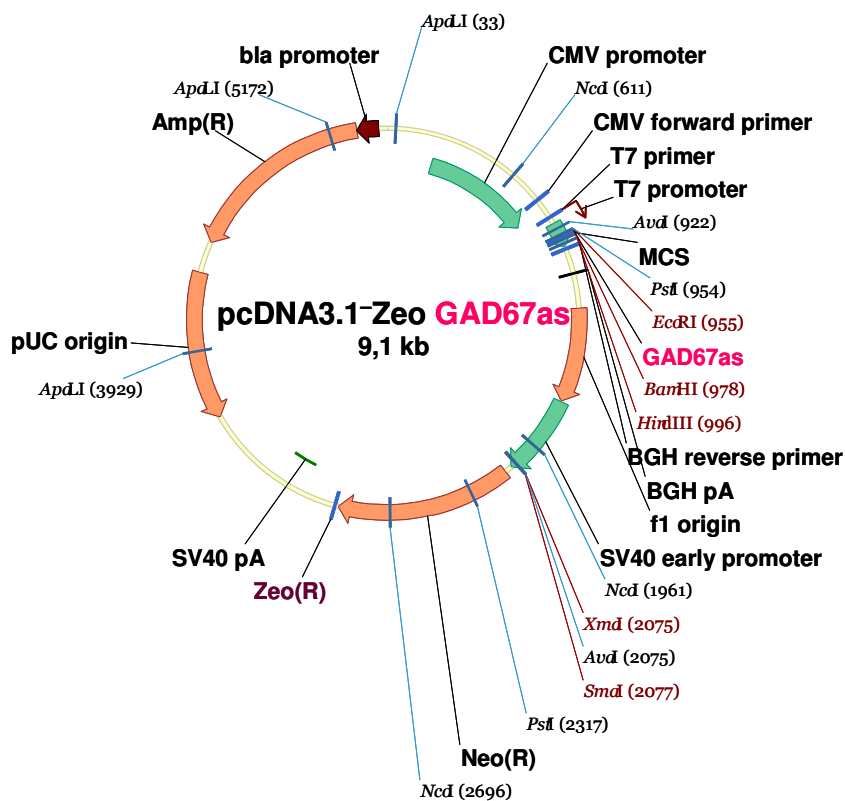


Abbildung 6: Vektorkarte von pcDNA3.1-Zeo GAD67as.

6.2. Strategien zur gezielten Suppression endogener GAD65 mRNA Expression in INS-1 Beta-Zellen

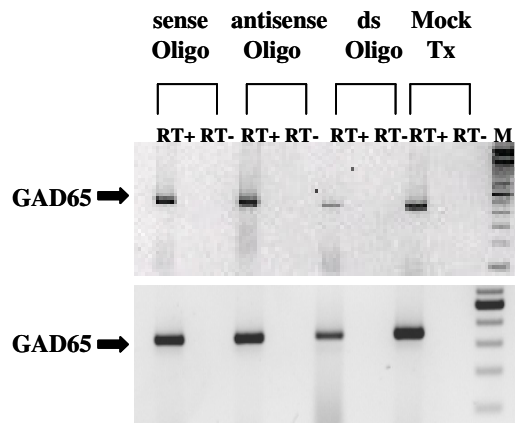
Ein Ansatz zur Inhibierung der Genexpression ist die Destabilisierung der entsprechenden mRNA. Verschiedene Effektormoleküle wirken spezifisch auf die mRNA von Zielgenen, zerstören diese, und können somit einen *knock-out*-Effekt hervorrufen. Eine Möglichkeit zur Repression der GAD65 Expression besteht in der sogenannten RNA-Interferenz, eine weitere Möglichkeit ist die Wirkung von antisense Transkripten.

6.2.1. GAD65 siRNA Transfektion in INS-1 Beta-Zellen

6.2.1.1. PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion

Um die GAD65 Expression spezifisch zu inhibieren, wird doppelsträngige RNA verwendet, deren beide Stränge je 21 Nukleotide besitzen und an ihren 3'-überhängenden Enden je 2 Thymidine tragen. Die Nukleotide beziehen sich auf die Nukleotide 103–125 der kodierenden Sequenz von GAD65 (Genbank Accession Nr.: M72422). Als Negativkontrolle werden einzelsträngige sense und antisense RNA Oligonukleotide eingesetzt. INS-1 Zellen, die endogen GAD65 exprimieren, werden mit sense, antisense und doppelsträngigen Oligonukleotiden transient transfiziert. Um zu überprüfen, ob die GAD65 spezifische siRNA selektiv mit der GAD65 mRNA interagiert, werden 24 h nach der Transfektion die Gesamt-RNA isoliert, DNase verdaut und 1 µg mRNA mit einem genspezifischen Primer (GAD65 rv) revers transkribiert. 2 µl der cDNA werden für eine PCR Amplifikation zum endogenen Nachweis von GAD65 mRNA eingesetzt. Die GAD65 siRNA Transfektion in INS-1 Beta-Zellen wird in zwei einzelne Experimente durchgeführt (s. Abbildung 7A). Die densitrometrische Auswertung der Gelbilder anhand der Stärke der sichtbaren Banden wird mit dem Computerprogramm Scion Image durchgeführt.

A



B

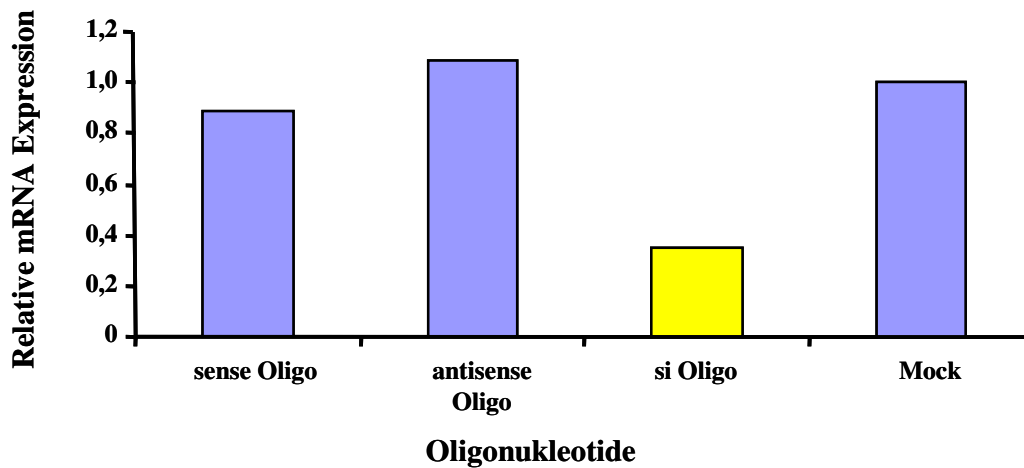


Abbildung 7: Sequenz-spezifische, posttranskriptionelle Suppression der GAD65 Expression durch RNA-Interferenz (siRNA) in INS-1 Beta-Zellen. INS-1 Zellen werden mit sense, antisense und doppelsträngigen GAD65 spezifischen siRNA Oligonukleotiden transfiziert. Die PCR-Reaktion für GAD65 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 45 sec, 94 °C; Annealing 45 sec, 58 °C; Elongation 1 min, 72 °C. (M = 100 bp DNA Leiter).

Tabelle 5: Relative GAD65 mRNA Expression von INS-1 Zellen. Die Mittelwerte (SU = Scanner Units) beziehen sich auf zwei einzelne Experimente. Die detektierte GAD65 mRNA wird in Bezug auf nicht transfizierte INS-1 Zellen (interne Kontrolle) normiert, diese wird als 100 % gesetzt.

Transfektion	Mittelwerte	Relative GAD65 mRNA Expression [%]
sense	2416,5	88
antisense	2958,5	108
ds	967,5	35
Mock	2732	100

Die Transfektion mit GAD65 siRNA reduziert die GAD65 Expression um 65 %. Dazu zeigen die Kontrollen keine Effekte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die in dem Experiment eingesetzte GAD65 siRNA wirksam ist.

6.2.2. Stabile Überexpression von GAD65 sense und antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen

In den folgenden Untersuchungen soll die GAD65 Expression durch den antisense Vektor in INS-1 Zellen spezifisch inhibiert werden und die Auswirkungen der Suppression auf den Beta-Zell-Phänotyp, auf die Funktion insulinproduzierender Zellen und auf die Resistenz/Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose untersucht werden.

6.2.2.1. PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion

INS-1 Zellen werden mit einem GAD65 sense Konstrukt (pcDNA3.1⁺GAD65, Gen in sense Richtung), einem GAD65 antisense Konstrukt (pcDNA3.1⁺GAD65, Gen in antisense Richtung) und einem leeren Vektor (pcDNA3.1⁺) stabil transfiziert. Die Konstrukte und der Leervektor werden zuvor für die stabile Transfektion mit FspI linearisiert. Aus den INS-1 Zellen wird die Gesamt-RNA isoliert, DNase behandelt und 2 µg mRNA mit einem genspezifischen Primer (BGH) revers transkribiert. Aus der cDNA wird GAD65 durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimer GAD65 sense und GAD65 antisense, die ein 478 bp Fragment liefern, amplifiziert. Das Ergebnis der Vektor-spezifischen RT-PCR ist in Abbildung 8 dargestellt.

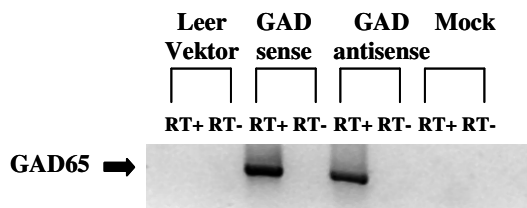


Abbildung 8: Stabile Überexpression von GAD65 sense und antisense mRNA. INS-1 Zellen werden transfiziert mit Leervektor bzw. mit Vektoren, welche GAD65 mRNA in sense und antisense Orientierung exprimieren. Klone mit stabiler Überexpression der Vektor mRNA werden selektioniert und mittels PCR charakterisiert.

6.2.3. Suppression der endogenen GAD65 mRNA Expression nach stabiler Überexpression von GAD65 antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen

6.2.3.1. PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion

Aus den stabil transfizierten INS-1 Zellen (s. Ergebnisteil 6.1.1.) wird 2 µg mRNA mit einem genspezifischen Primer (GAD65 rv) revers transkribiert. Aus der cDNA wird GAD65 durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimer GAD65 sense und GAD65 antisense, die ein 478 bp Fragment liefern, amplifiziert. Das Ergebnis der spezifischen RT-PCR zum Nachweis endogener GAD65 mRNA ist in Abbildung 9 dargestellt.

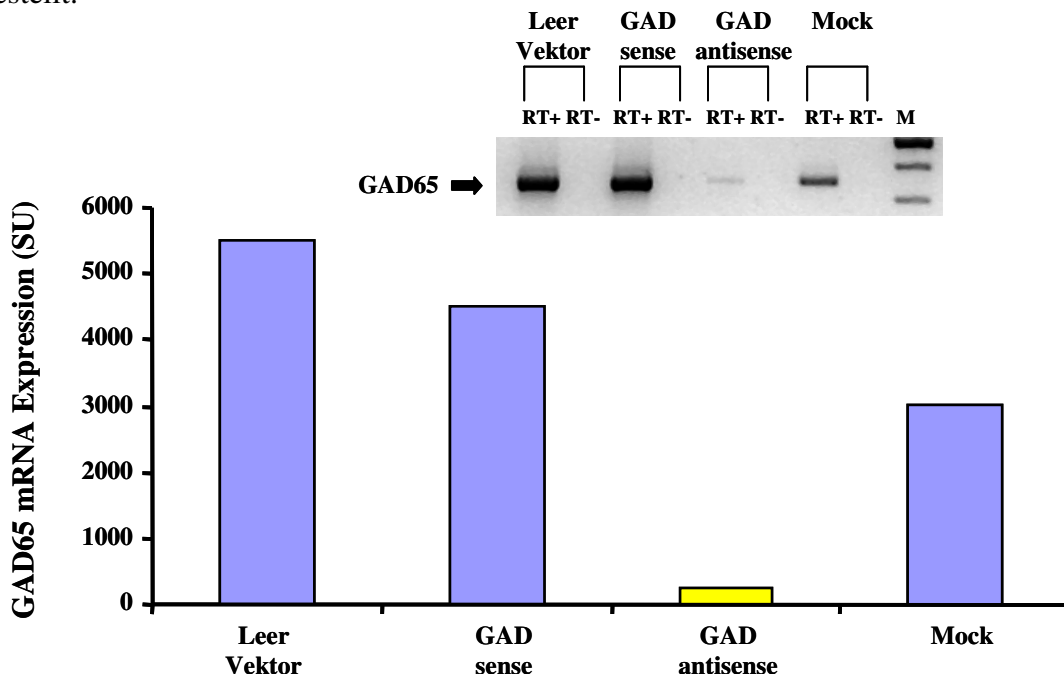


Abbildung 9: Suppression endogener GAD65 mRNA durch stabile Überexpression von GAD65 antisense mRNA. Endogene Expression von GAD65 mRNA wurde mit spezifischer RT-PCR analysiert. Überexpression von GAD65 antisense mRNA führt zu nahezu kompletter Suppression der endogenen GAD65 mRNA Expression.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die stabile Überexpression von GAD65 antisense mRNA die Suppression endogener GAD65 mRNA bewirkt.

6.2.4. Einfluss der Suppression von GAD65 auf die pankreatische Beta-Zell-spezifische Genexpression

6.2.4.1. Expression von Beta-Zell-spezifischen Genen

Die Genexpression von Beta-Zell-spezifischen Genen, wie IDX1, Proinsulin, Glukokinase, GLUT2, BETA2, Pax4 und Nkx6.1 soll untersucht werden. Aus den INS-1 Zellklonen (s. Ergebnisteil 6.2.) wird Gesamt-RNA isoliert, DNase verdaut, und 3 µg mRNA mit einem Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer revers transkribiert. 2 µl der cDNA werden für die jeweiligen PCR Amplifikation eingesetzt. Die PCR-Bedingungen für die cDNA Amplifikation von BETA2 und Pax4 konnten bis zu diesem Zeitpunkt nicht erfolgreich etabliert werden. In den Abbildungen 10–14 sind die Ergebnisse der jeweiligen PCR Amplifikation dargestellt.

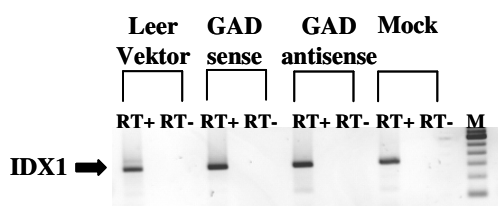


Abbildung 10: Nachweis von IDX1 mRNA in GAD65-supprimierten INS-1 Beta-Zellen. Die PCR-Reaktion für IDX1 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 45 sec, 94 °C; Annealing 45 sec, 64 °C; Elongation 1 min, 72 °C. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

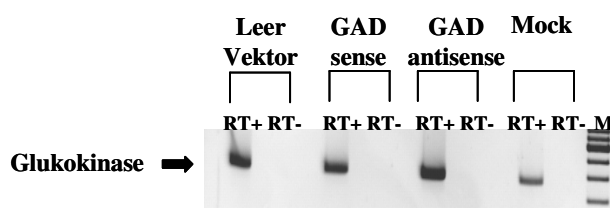


Abbildung 11: Nachweis von Glukokinase mRNA in GAD65-supprimierten INS-1 Beta-Zellen. Die PCR-Reaktion für Glukokinase besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 30 sec, 94 °C; Annealing 3 min, 68 °C; Elongation 3 min, 68 °C. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

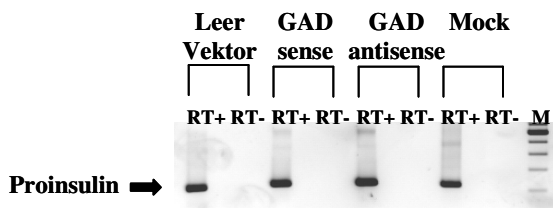


Abbildung 12: Nachweis von Proinsulin mRNA in GAD65-supprimierten INS-1 Beta-Zellen. Die PCR-Reaktion für Proinsulin besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 45 sec, 94 °C; Annealing 45 sec, 54 °C; Elongation 1 min, 72 °C. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

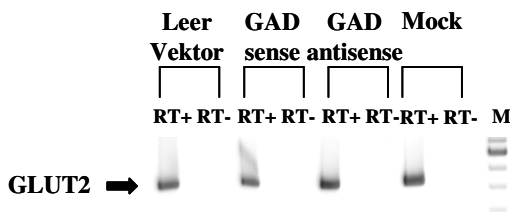


Abbildung 13: Nachweis von GLUT2 mRNA in GAD65-supprimierten INS-1 Beta-Zellen. Die PCR-Reaktion für GLUT2 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 45 sec, 94 °C; Annealing 45 sec, 56,5 °C; Elongation 1 min, 72 °C. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

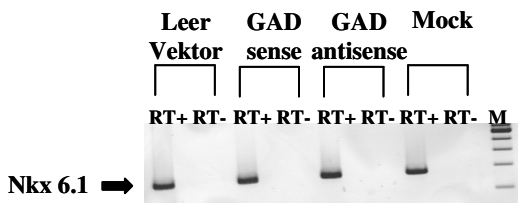


Abbildung 14: Nachweis von Nkx6.1 mRNA in GAD65-supprimierten INS-1 Beta-Zellen. Die PCR-Reaktion für Nkx6.1 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 30 sec, 94 °C; Annealing 3 min, 68 °C; Elongation 3 min, 68 °C. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle. (M = 100 bp DNA Leiter).

6.2.5. Einfluss der Suppression von GAD65 auf die Insulinsekretionskapazität der Zellen

6.2.5.1. Glukose-induzierte Insulinsekretion

In diesem Versuch wird die Auswirkung der GAD65 Suppression auf die Glukose-abhängige Insulinsekretion in INS-1 Zellen untersucht. Die Aussaat der Zellen erfolgt in einer Zellkulturplatte (24 Vertiefungen, Flachboden) mit je 500 µl Kulturmedium und 2×10^5 Zellen pro Vertiefung, wie in Abschnitt 5.4.2.1. beschrieben. Es werden je 4 Vertiefungen mit Glukose 2,25 mM, 5,6 mM, 11,1 mM und 18 mM stimuliert. Die mit dem Leervektor (pcDNA3.1⁺) transfizierten Zellen dienen als Kontrolle (Mock). Mittels

ELISA wird die Insulinsekretion nach 1 h in den Zellkulturüberständen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Das Diagramm (Abbildung 15) zeigt grafisch die Insulinsekretion der unterschiedlichen INS-1 Zelllinien. Die Angaben in der Tabelle und dem Diagramm entsprechen dem sezernierten Insulin in $\mu\text{g/l}$.

Tabelle 6: Insulinsekretion von INS-1 Zellen nach 1 h. Die Mittelwerte beziehen sich auf 4 einzelne Messungen eines Einzelexperimentes.

Stimulation Glukose	Mock	GAD65 sense	GAD65 antisense
2,25 mM	0,828 $\mu\text{g/l}$	1,079 $\mu\text{g/l}$	1,671 $\mu\text{g/l}$
5,6 mM	0,514 $\mu\text{g/l}$	1,395 $\mu\text{g/l}$	1,021 $\mu\text{g/l}$
11,1 mM	2,53 $\mu\text{g/l}$	2,293 $\mu\text{g/l}$	1,972 $\mu\text{g/l}$
18 mM	1,128 $\mu\text{g/l}$	1,997 $\mu\text{g/l}$	1,897 $\mu\text{g/l}$

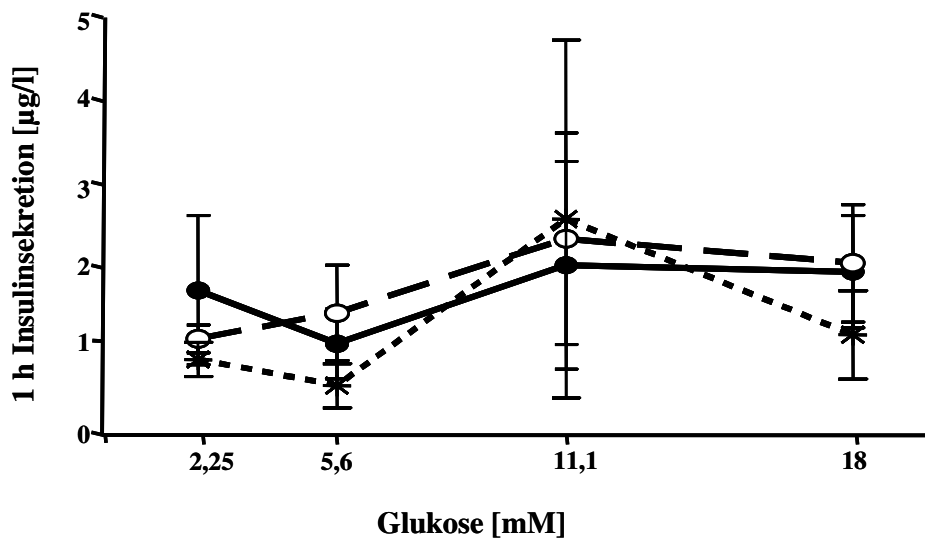


Abbildung 15: Insulinsekretion in INS-1 Zellen mit reduzierter GAD65 Expression (antisense mRNA, s. Abbildung 9). Überstände von INS-1 Zellen wurden mittels ELISA untersucht und die Insulinsekretion nach 1 h bestimmt. Glukosekonzentrationen: 2,25 mM, 5,6 mM, 11,1 mM, 18 mM. Keine Unterschiede der sekretorischen Kapazität zwischen GAD65-supprimierten INS-1 Zellklonen und Kontrollzellen. (Tx = Transfektion, $\text{---}\circ\text{---}$ INS-1 Tx mit sense Vektorkonstrukt pcDNA3.1⁺GAD65, $\text{---}\bullet\text{---}$ INS-1 Tx mit antisense Vektorkonstrukt pcDNA3.1⁺GAD65, $\text{---}\ast\text{---}$ INS-1 Mock).

6.2.6. Einfluss der Suppression von GAD65 auf die apoptotischen Eigenschaften der Zellen

6.2.6.1. Zytokin-induzierte Apoptose

Dazu werden INS-1 Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors Zykloheximid (CHX) kultiviert. Die Zellen werden anschließend mit quervernetztem Fas-L, quervernetztem TRAIL, $IL1\beta$, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und Kombinationen von zwei ($IFN\gamma+TNF\alpha$, $IFN\gamma+IL1\beta$, $TNF\alpha+IL1\beta$) oder drei (Zyt Mix: $IFN\gamma+TNF\alpha+IL1\beta$) Zytokinen stimuliert (s. 5.4.1.). Ermittelt werden die Mittelwerte (Daten nicht aufgeführt) aus 3 einzelnen Messungen eines Einzelerperimentes mit den zugehörigen Standardabweichungen (Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt). Die Kontrolle (nicht stimulierte INS-1 Zellen) wird als 100 % gesetzt.

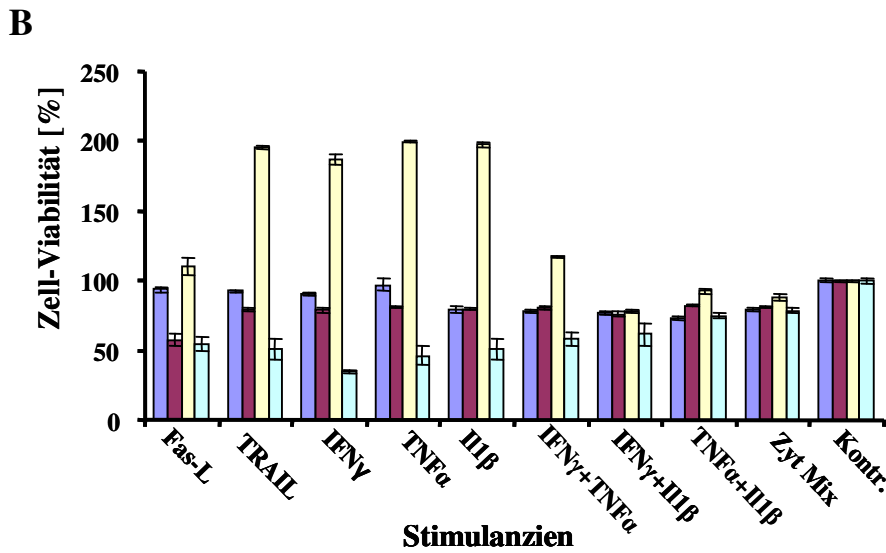
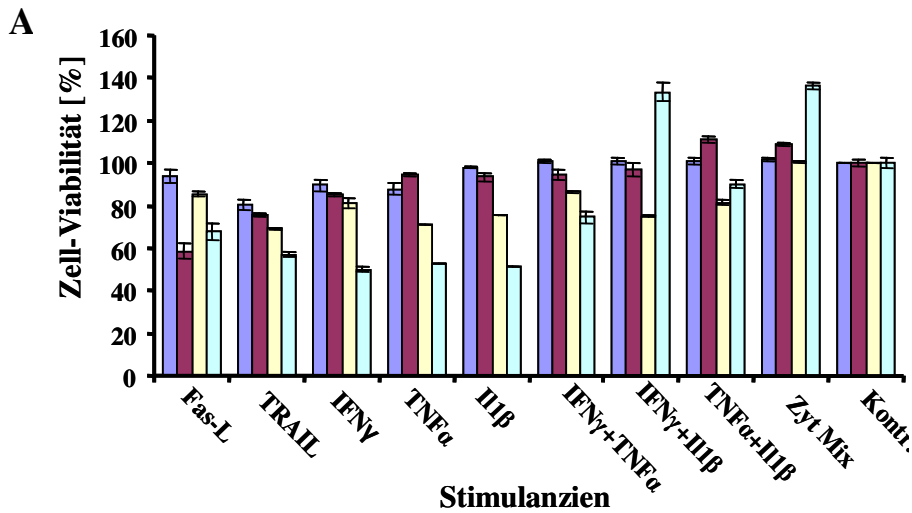


Abbildung 16: Unveränderte Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose in GAD65-supprimierten INS-1 Zellklonen. INS-1 Zellen werden mit quervernetztem Fas-L (200 ng/ml, 1 μ g/ml M2), quervernetztem TRAIL (200 ng/ml, 1 μ g/ml M2), IFN γ (100 ng/ml), TNF α (1 μ g/ml), IL1 β (10 ng/ml) und Kombinationen von zwei und drei Zytokinen für 48 h in Anwesenheit (A) oder Abwesenheit (B) von CHX (50 μ g/ml) stimuliert. Nicht stimulierte INS-1 Zellen (Kontr.) dienen als interne Kontrolle. Die Quantifizierung der Zell-Viabilität erfolgt mittels Kristallviolett-Färbung. (Tx = Transfektion, ■ INS-1 Tx mit Leervektor pcDNA3.1⁺, ■ INS-1 Tx mit sense Vektorkonstrukt pcDNA3.1⁺GAD65, ■ INS-1 Tx mit antisense Vektorkonstrukt pcDNA3.1⁺GAD65, ■ INS-1 Mock).

6.3. Strategie zur gezielten Suppression endogener GAD67 mRNA Expression in INS-1 Beta-Zellen

6.3.1. PCR-Nachweis der Transkription nach Transfektion

Dazu werden INS-1 Zellen mit einem GAD67 sense Konstrukt (pcDNA3.1⁺GAD67, Gen in sense Richtung), einem GAD67 antisense Konstrukt (pcDNA3.1⁻GAD67, Gen in antisense Richtung) und einem leeren Vektor (pcDNA3.1⁻) stabil transfiziert. Die Konstrukte und der Leervektor werden zuvor für die stabile Transfektion mit FspI linearisiert. Aus den INS-1 Zellen wird die Gesamt-RNA isoliert, DNase behandelt und 2 µg mRNA mit einem genspezifischen Primer (pcDNA3.1⁻ rv) revers transkribiert. Mithilfe der Oligonukleotidprimer GAD67 sense und GAD67 antisense, die ein 355 bp Fragment liefern, wird aus der cDNA GAD67 durch PCR amplifiziert. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Vektor-spezifischen RT-PCR. Die endogene Expression von GAD67 mRNA wird ebenso mit spezifischer RT-PCR analysiert unter Anwendung des GAD67 rv Primers. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen.

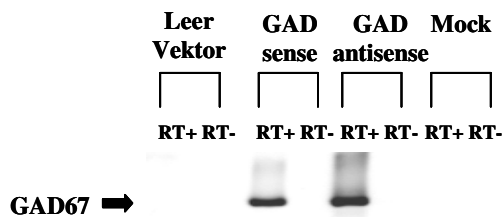


Abbildung 17: Expression von GAD67 sense und antisense mRNA. INS-1 Zellen werden transfiziert mit Leervektor bzw. mit Vektoren, welche GAD67 mRNA in sense und antisense Orientierung exprimieren. Klone mit stabiler Expression der Vektor mRNA werden selektiert und mittels PCR charakterisiert.

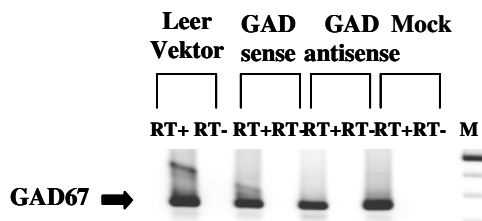


Abbildung 18: Expression endogener GAD67 mRNA. Stabile Expression von GAD67 antisense mRNA führt zu keiner kompletten Suppression der endogenen GAD67 mRNA Expression in stabil transfizierten INS-1 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen.

Anhand dieser Ergebnisse kann der Schluss gezogen werden, dass GAD67 antisense mRNA zwar exprimiert wird, aber dieses Ausmaß an Expression jedoch nicht ausreicht,

um eine endogene Suppression der GAD67 mRNA zu bewirken. Es werden noch weitere Studien erforderlich sein, um dies zu klären.

6.4. Das Tet-on-System

In dem von Gossen und Bujard (1992) entwickelten Tetrazyklin (tet)-regulierten System werden prokaryotische Regulationseinheiten aus *E. coli* zur regulierten Genexpression in eukaryotischen Zellen eingesetzt [51, 84]. Der Promotor setzt sich aus regulatorischen Elementen des Tn10 spezifischen Tetrazyklin-Resistenz-Operons (tetO) von *E. coli*, die mit einem minimalen eukaryotischen Promotor (gewöhnlich mit dem *Immediate Early* Zytomegalovirus (CMV) Promotor) ligiert werden, zusammen. Zur Transkription ist die Bindung eines koexprimierten chimären Transaktivators (tTa) erforderlich, der aus der Tetrazyklin-Repressor-Domäne (tetR) von *E. coli* zur Anbindung an den Promotor und der potenten viralen Transkriptionsaktivator-Domäne VP16 des Herpes Simplex Virus zur Aktivierung der Expression besteht. Dieses System zur gezielten Genexpression ist mittlerweile in zwei Versionen auch kommerziell erhältlich (Firma Clontech, Palo Alto, USA). Durch die Zugabe von Tetrazyklin wird die Bindung des tTA an den Promotor und so die transkriptionelle Aktivierung reprimiert. Dieses System wird als Tet-off bezeichnet. In einer zweiten Variante, die als Tet-on-System bezeichnet wird und auf einer mutierten tetR-Sequenz basiert, wird der Transaktivator durch die Zugabe von Tetrazyklin aktiviert und erlangt die Fähigkeit an den Promotor zu binden und somit die Transkription zu starten. Da dieses Transaktivatormolekül revers zum originalen tTa agiert, wird es als reverser Transaktivator (rtTA) bezeichnet. Die Möglichkeit einer kontrollierten, zellspezifischen Überexpression von GAD65 und GAD67 sense mRNAs und antisense mRNAs in INS-1 Beta-Zellen wird in dieser Arbeit durch das Tet-on-System mit folgenden Komponenten (A+B) genutzt:

- A) Ein induzierbares Expressionsplasmid – pUHD10-3 – in welchem die mRNAs von GAD65 und GAD67 in sense und antisense Orientierung unter der Kontrolle des Zytomegalovirus-Promotors (PhCMV) und von sieben multimerisierten Tetrazyklin-Operator Sequenzen (TetO7) stehen.
- B) Ein regulatorisches Plasmid pUHD-172-1-MIP-SAR, welches für den Tetrazyklin-Aktivator (Tet-Aktivator) kodiert. Der Tet-Aktivator steht unter der Kontrolle des Maus Proinsulin Genpromotors (MIP). Zugabe von Tetrazyklin zum Kulturmedium bewirkt dessen Bindung an den Tet-Aktivator. Dieser Komplex bindet sich mit hoher

Affinität an die TetO7 Sequenz und ermöglicht somit die Transkription von GAD. In Abwesenheit von Tetrazyklin verändert sich die Konformation des Tet-Aktivators, sodass er nicht mehr an den Operator binden kann. Dies blockiert die Transkription von GAD.

Die Tetrazykline sind Antibiotika, die aus Streptomyces Arten gewonnen werden. Doxyzykline gehören zur Wirkstoffgruppe der Tetrazykline. Zur Induktion des Tet-on-Systems wird das Kulturmedium mit Doxyzyklin versetzt. Die Vektoren besitzen ein nukleäres Translokationssignal (nls), welches den aktiven Transport durch die Kernmembran erlaubt, und ein SAR-Element. SARs bzw. S/MARs sind DNA-Strukturelemente [11], die eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zellkerns spielen. Dort übernehmen sie wichtige Aufgaben bei der Regulation der DNA-Transkription und -Replikation [129]. In stabilen Transfektionen stimulieren sie die Transkriptionsinitiationsraten [11, 73] der integrierten Gene. Historisch werden sie, je nach Methode der Isolierung, als SARs (*Scaffold Attachment Regions*) oder MARs (*Matrix Associated Regions*) bezeichnet. Sie haben eine Länge von 200–3000 bp und zeichnen sich zumeist durch AT-Reichtum [11] aus. Die Funktionsweise dieser Elemente im Hinblick auf die regulatorischen Prozesse ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [11].

6.4.1. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD65 (5,4 kb)

6.4.1.1. Klonierungsstrategie

Das Konstrukt entsteht durch Umklonierung der GAD65 sense cDNA aus dem pcDNA3.1⁺GAD65 sense Konstrukt (Restriktion mit EcoRI) in den mit EcoRI geöffneten pUHD10-3 Vektor. Der Erfolg der Klonierung wird durch zwei Restriktionsspaltungen überprüft und gibt eine Übereinstimmung der zu erwartenden Fragmente.

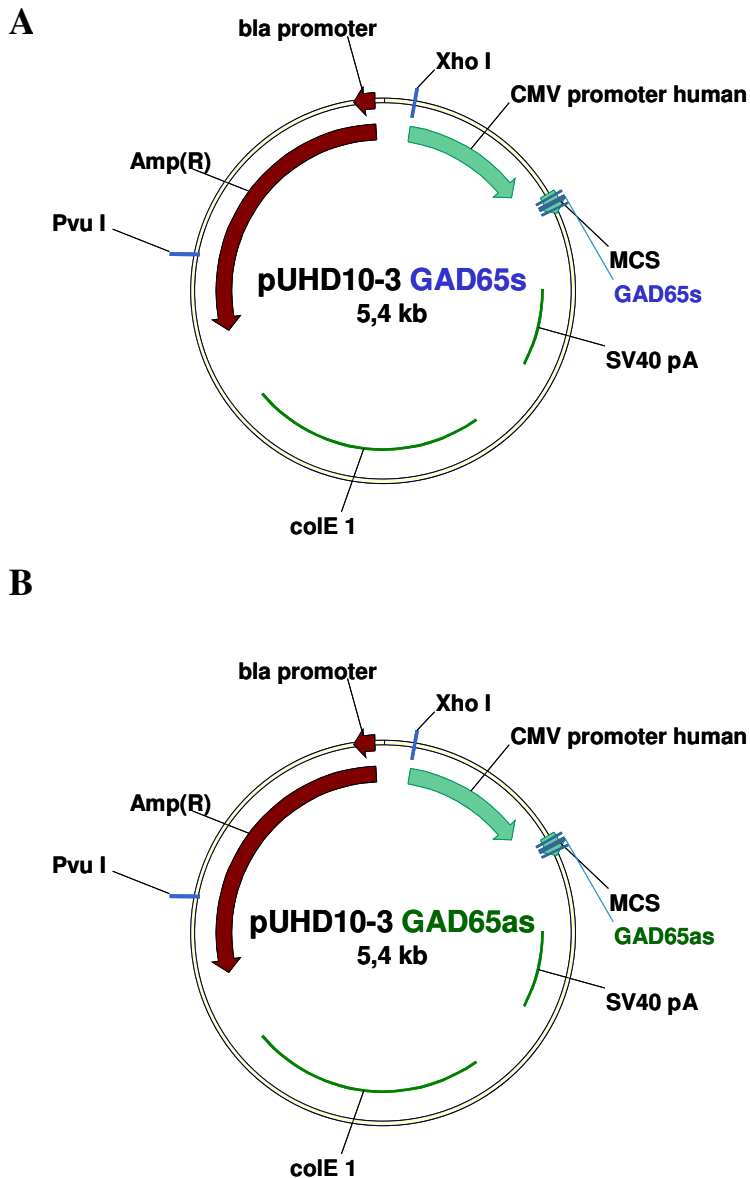


Abbildung 19: Vektorkarte von pUHD10-3 GAD65s (A).
Vektorkarte von pUHD10-3 GAD65as (B).

6.4.2. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65 (8,5 kb)

6.4.2.1. Klonierungsstrategie

Aus den sense und antisense Vektorkonstrukten pUHD10-3 GAD65 werden durch Restriktion mit XhoI und HindIII die 3,2 kb Fragmente des Ratten GAD65 sense und GAD65 antisense isoliert und in den mit PvuII geöffneten Vektor pUHD-172-1-MIP-SAR ligiert. Die Identität der Konstrukte wird mit einer Restriktionsspaltung überprüft und gibt eine Übereinstimmung mit den zu erwartenden Fragmenten.

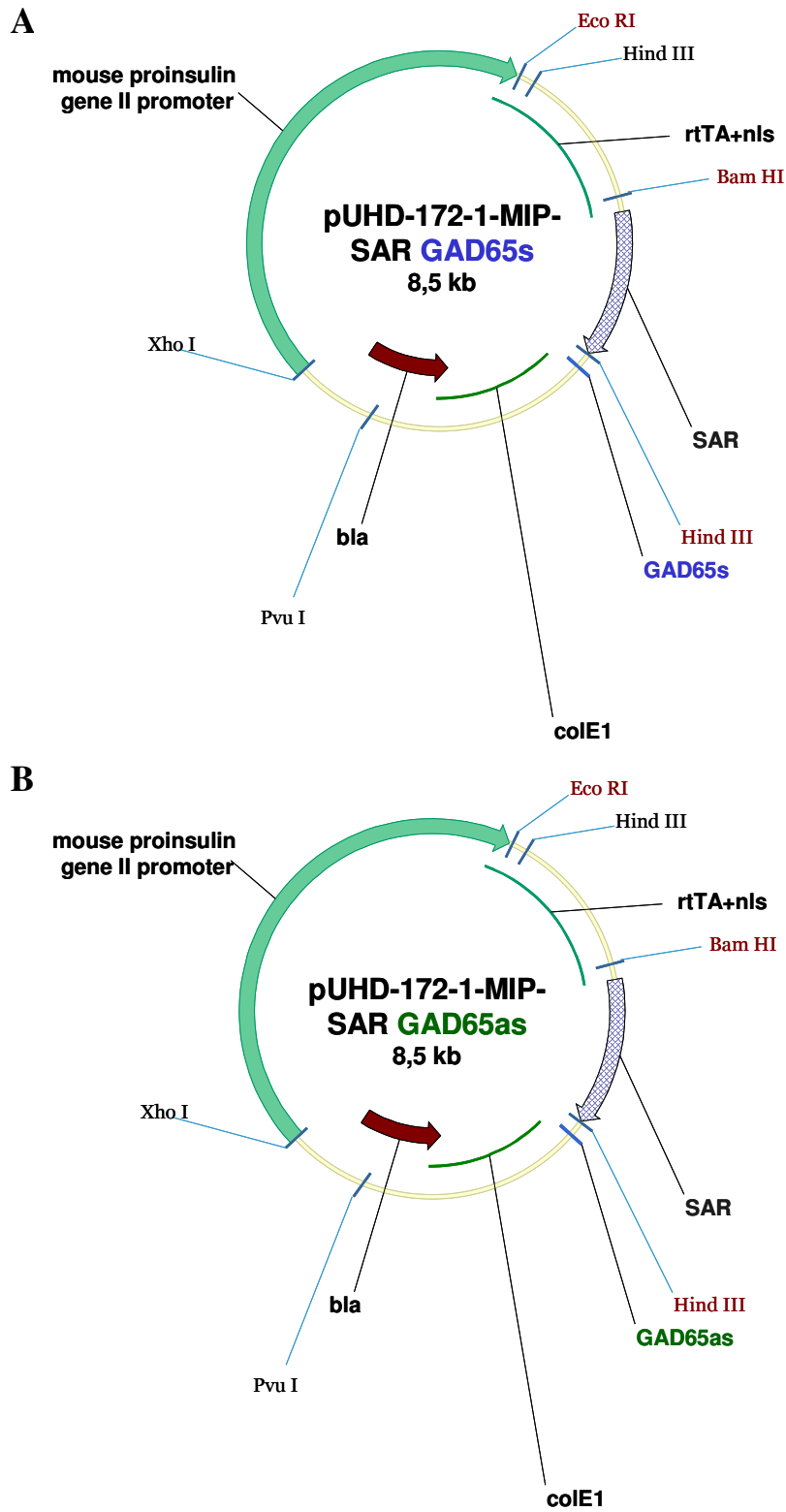
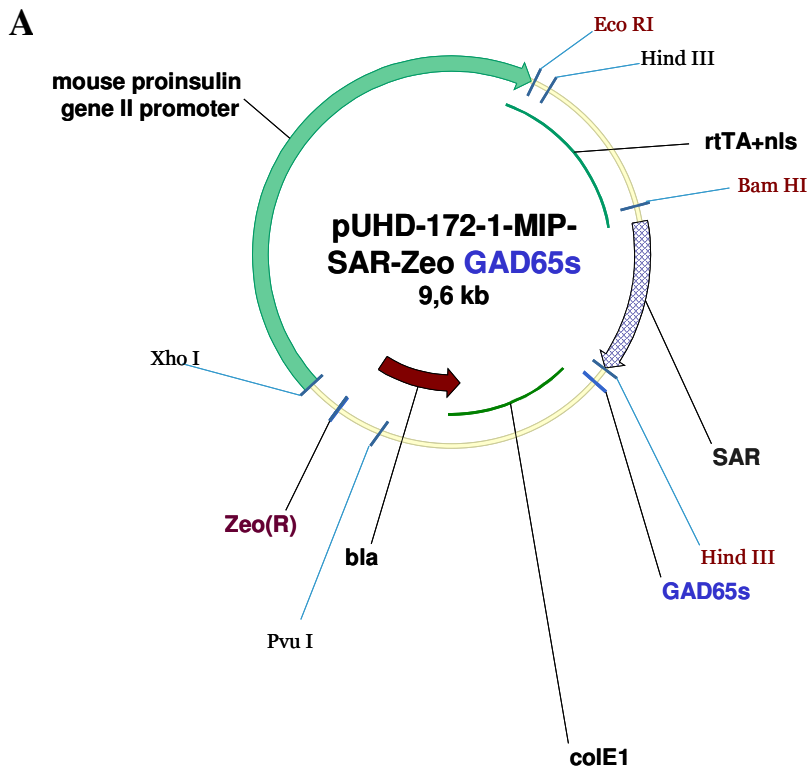


Abbildung 20: Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65s (**A**).
Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65as (**B**).

6.4.3. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 (9,6 kb)

6.4.3.1. Klonierungsstrategie

Das (End)Konstrukt entsteht durch Umklonierung der Zeozin Resistenzkassette aus dem pSV40/Zeo Vektor (Restriktion mit EcoRV und PvuII) in denen mit ScaI geöffneten sense und antisense pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65 Konstrukten. Der Erfolg der Klonierung wird durch zwei Restriktionsspaltung überprüft und gibt eine Übereinstimmung der zu erwartenden Fragmente.



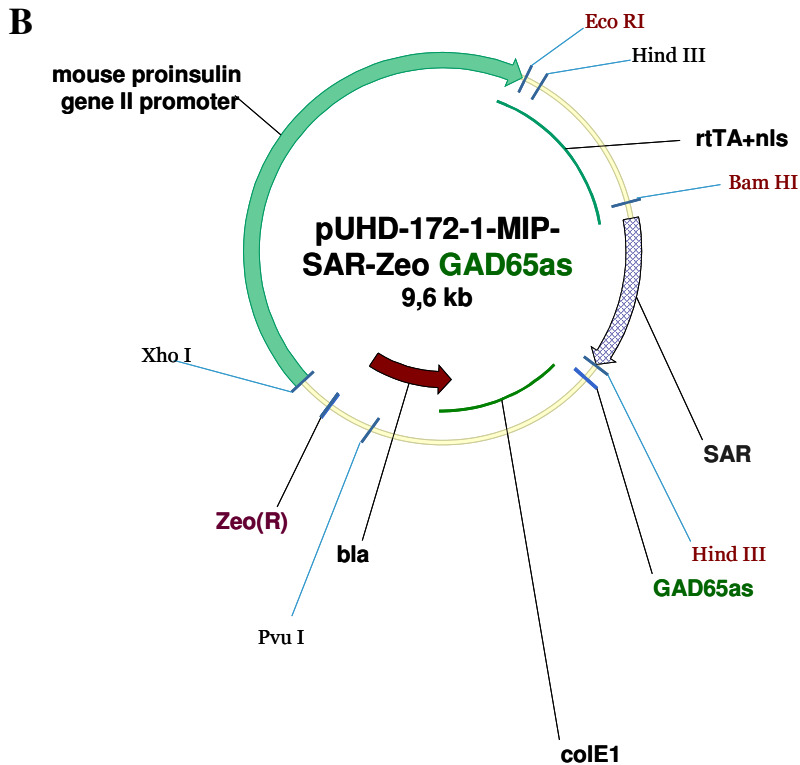
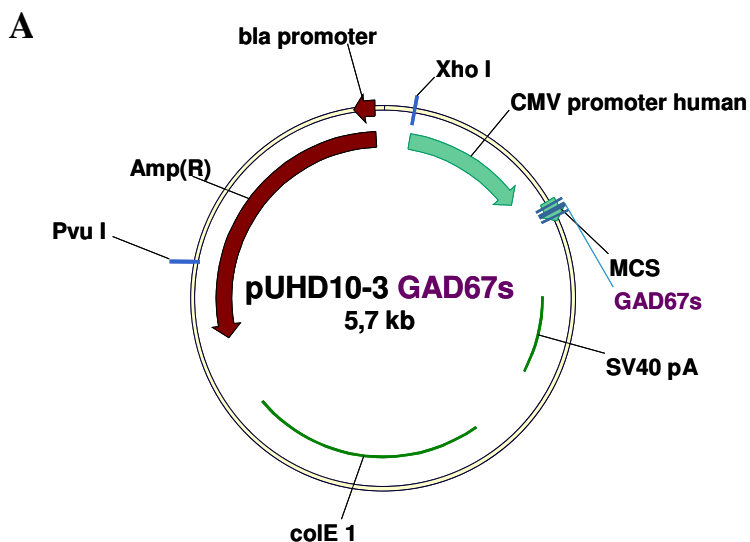


Abbildung 21: Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65s (A).
Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65as (B).

6.4.4. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD67 (5,7 kb)

6.4.4.1. Klonierungsstrategie

Ein 2,6 kb Fragment des GAD67 Gens aus dem pBluescript SK GAD67 sense Konstrukt (Restriktion mit PstI), wird in den mit EcoRI geöffneten Vektor pUHD10-3 ligiert. Die Identität der Konstrukte wird mit einer Restriktionsspaltung überprüft und ergibt eine Übereinstimmung mit den zu erwartenden Fragmenten.



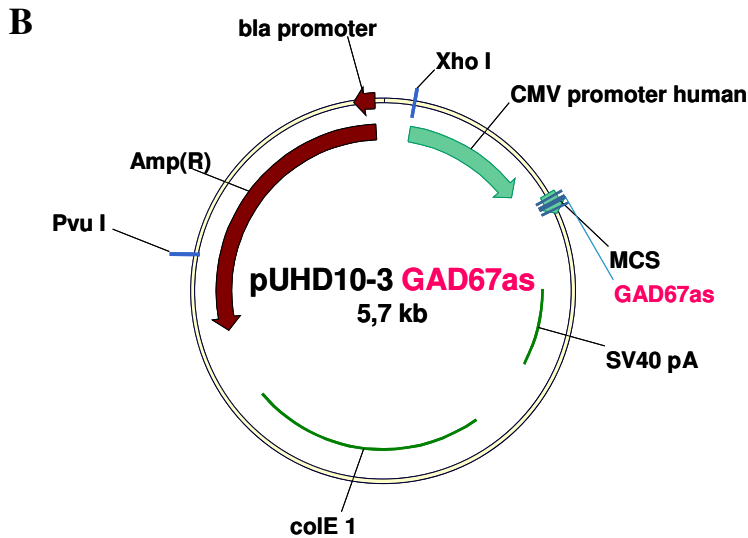
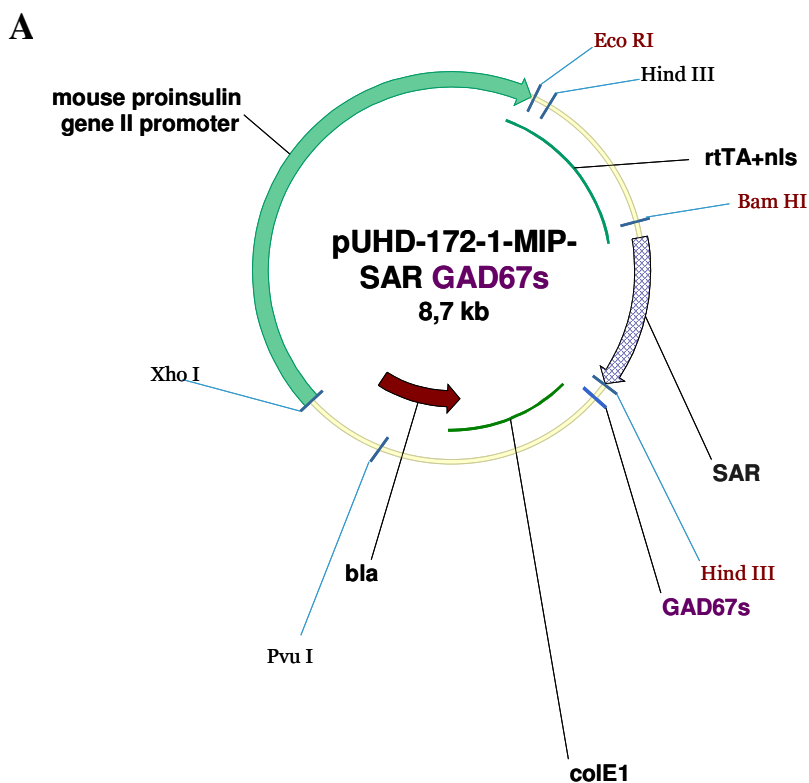


Abbildung 22: Vektorkarte von pUHD10-3 GAD67s (A).
Vektorkarte von pUHD10-3 GAD67as (B).

6.4.5. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR GAD67 (8,7 kb)

6.4.5.1. Klonierungsstrategie

Zur Verfügung steht bereits der Vektor pUHD-172-1-MIP-SAR, welcher mit PvuII geöffnet wird, um die jeweiligen 3,5 kb Fragmente des Ratten GAD67 aus den sense und antisense Vektorkonstrukten pUHD10-3 GAD67 (Restriktion mit XhoI und NaeI), durch Ligation einzufügen. Zur Überprüfung der Konstrukte wird eine Restriktionsspaltung durchgeführt. Die resultierenden Fragmente bestätigen den Erfolg der Klonierung.



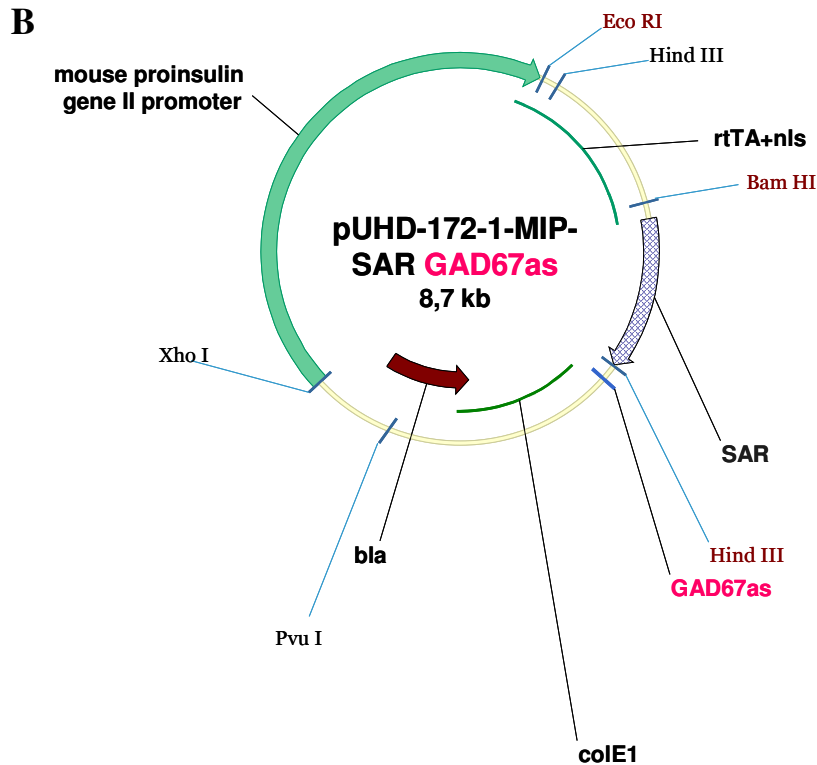


Abbildung 23: Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR GAD67s (A).
Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR GAD67as (B).

6.4.6. Klonierung des sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD-172-1-MIP-SAR-Bsd GAD67 (10 kb)

6.4.6.1. Klonierungsstrategie

Da die Insertion des Fragmentes GAD67 (3,5 kb) aus dem antisense pUHD10-3 GAD67 Konstrukt durch eine gerichtete Klonierung in den antisense pUHD-172-1-MIP-SAR GAD65 Vektor nicht realisierbar war, wurde die Klonierungsstrategie modifiziert. Das (End)Konstrukt entsteht durch Umklonierung der Blastizidin Resistenzkassette (1,3 kb) aus dem pCMV/Bsd Vektor (Restriktion mit EcoRV und HindIII) in denen mit PvuI geöffneten sense und antisense pUHD-172-1-MIP-SAR GAD67 Konstrukten. Der Erfolg der Klonierung wird mithilfe einer Restriktionsspaltung überprüft und gibt eine Übereinstimmung der zu erwartenden Fragmente. Nach zahlreichen Ligationsversuchen konnten jedoch ausschließlich nur antisense pUHD-172-1-MIP-SAR-Bsd GAD67 Konstrukte isoliert werden.

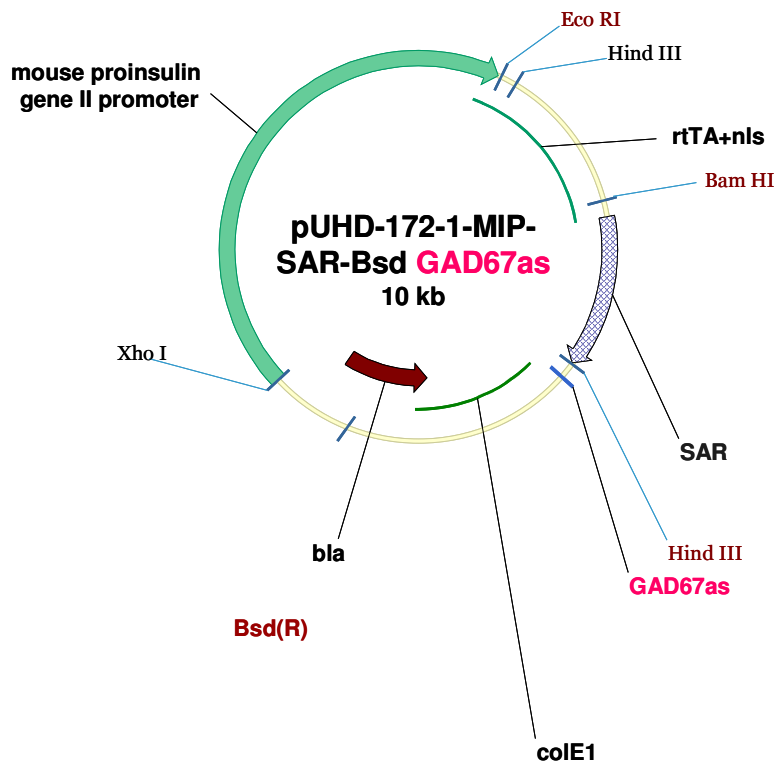


Abbildung 24: Vektorkarte von pUHD-172-1-MIP-SAR-Bsd GAD67as.

Ziel sollte die Etablierung einer stabilen INS-1 Beta-Zelllinie mit Tetrazyklin-induzierbarer Überexpression von antisense GAD65 und GAD67 mRNA sein.

6.4.7. Transiente Transfektion von INS-1 Zellen mit dem sense und antisense Vektorkonstrukt pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 (9,6 kb)

Der größte Vorteil von transienten Expressionsanalysen ist der Zeitaufwand. Stabil transgene Linien zu erhalten kann mehrere Monate in Anspruch nehmen, während transiente Expressionsexperimente in mehreren Tagen durchgeführt werden können. In Vorversuchen sollte zunächst die Doxyzyklin-abhängige Expression gezeigt werden. Wichtige Fragen, die an diesem Punkt zu beantworten sind, sind folgende:

- In welchem Ausmaß lässt sich durch Zugabe von Doxyzyklin die Expression der GAD65 antisense mRNA stimulieren?
- In welchem Ausmaß supprimiert die Überexpression der GAD65 antisense mRNA die Expression der endogenen GAD65 mRNA?

Induziert werden Zellen, die den Doxyzyklin-abhängigen Promotor sowie das dahinter befindliche Gen (GAD65) transient in ihr Genom integriert haben und den reversen

Transaktivator rtTA konstitutiv exprimieren. Die Induktion erfolgt mit 1 ng/ml Doxyzyklin pro ml Medium für 24 h und mit 10 µg/ml Doxyzyklin pro ml Medium für 48 h. Nach der Transfektion wird aus den INS-1 Zellen die Gesamt-RNA isoliert, DNase behandelt und 3 µg mRNA mit einem genspezifischen Primer (SAR rv) revers transkribiert. Aus der cDNA wird GAD65 durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimer GAD65 sense und GAD65 antisense, die ein 478 bp Fragment liefern, amplifiziert. Das Ergebnis der Vektor-spezifischen RT-PCR ist in Abbildung 25A und Abbildung 26A dargestellt. Die endogene Expression von GAD65 mRNA wird ebenfalls mit der gleichen RT-PCR Methodologie überprüft unter Anwendung des GAD65 rv Primers. Dieses Resultat ist in Abbildung 25B und Abbildung 26B zu sehen.

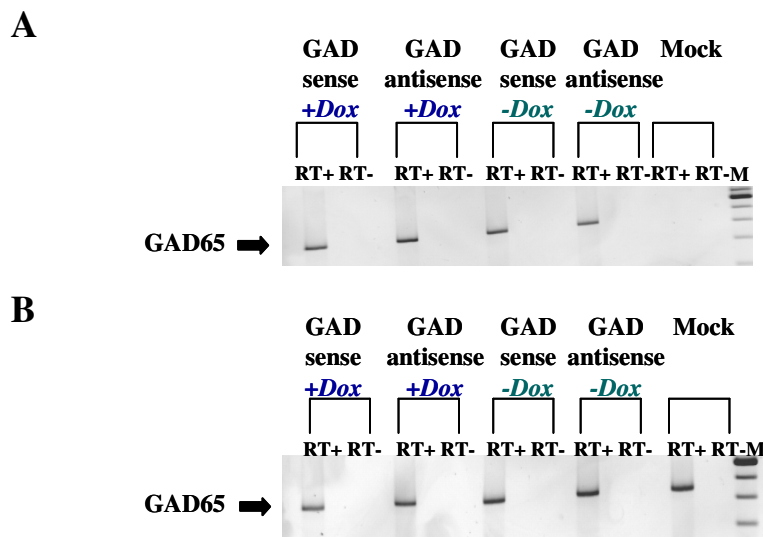
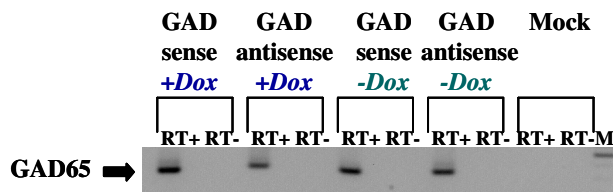


Abbildung 25: Analyse der Induzierbarkeit der GAD65 Expression durch Doxyzyklin nach transienter Transfektion mit dem sense und antisense Vektorkonstrukt pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 mittels RT-PCR. INS-1 Zellen, die 24 h mit 1 ng/ml Doxyzyklin (Dox) inkubiert werden, zeigen eine stärkere GAD65 antisense mRNA Expression verglichen mit der ohne Dox-Zugabe induzierten Zellen (A). Transiente Expression von GAD65 antisense mRNA führt zu keiner kompletten Suppression der endogenen GAD65 mRNA Expression in transient transfizierten INS-1 Zellen nach Dox-Induktion (B). Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle.

A



B

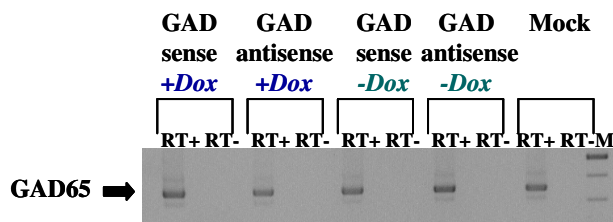


Abbildung 26: Analyse der Induzierbarkeit der GAD65 Expression durch Doxyzyklin nach transienter Transfektion mit dem sense und antisense Vektorkonstrukt pUHD-172-1-MIP-SAR-Zeo GAD65 mittels RT-PCR. Die transiente Transfektion von INS-1 Zellen, die 48 h mit 10 µg/ml Doxyzyklin (Dox) bzw. ohne Dox-Zugabe inkubiert werden, führt zu keiner kompletten Suppression der endogenen GAD65 mRNA Expression nach Dox-Induktion verglichen mit Kontrollzellen. Nicht transfizierte INS-1 Zellen dienen als Kontrolle.

Diese Daten belegen, dass sich unter Anwendung des Tet-on-Systems auf der mRNA Ebene eine Expression von GAD65 antisense mRNA zwar abzeichnet, aber dieses Ausmaß an Expression jedoch nicht ausreicht, um eine endogene Suppression der GAD65 mRNA zu bewirken. Es werden noch weitere Untersuchungen notwendig sein, um dies zu klären.

6.5. GAD Expression in primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen

Ein 523 bp Fragment der humanen GAD65 wird mittels PCR unter Verwendung der Primer hGAD65s und hGAD65as aus cDNA amplifiziert. Diese cDNA wird aus primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen isoliert. Für eine PCR Amplifikation wird 2 µl der cDNA eingesetzt.

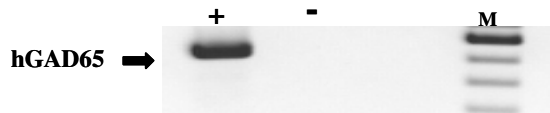


Abbildung 27: Nachweis von humaner GAD65 mRNA in primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen. Gesamt-RNA aus primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen wurde isoliert, DNase verdaut und mit einem Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer revers transkribiert. Die PCR-Reaktion für humane GAD65 besteht aus 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung 30 sec, 94 °C; Annealing 3 min, 68 °C; Elongation 3 min, 68 °C. (+ = mit cDNA, - = ohne cDNA, M = 100 bp DNA Leiter).

6.5.1. Klonierung des humanen sense und antisense Vektorkonstruktes pUHD10-3 GAD65 (5 kb)

6.5.1.1. Klonierungsstrategie

Ein 2 kb Fragment des humanen GAD65 Gens aus dem pBluescript SK Vektor (Restriktion mit SacI/EcoRI) wird in den mit EcoRI geöffneten Vektor pUHD10-3 ligiert. Die Identität der Konstrukte wird mit einer Restriktionsspaltung überprüft und ergibt eine Übereinstimmung mit den zu erwartenden Fragmenten. Trotz einiger Ligationsversuche war es bis zu diesem Zeitpunkt jedoch ausschließlich möglich, humane sense Vektorkonstrukte zu gewinnen.

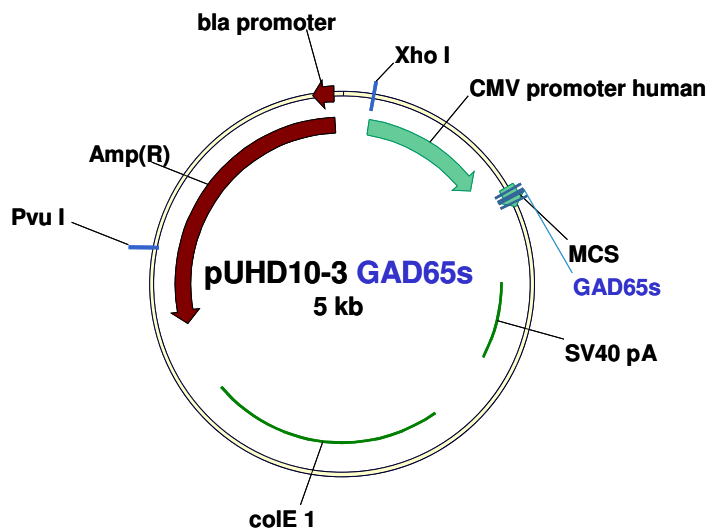


Abbildung 28: Vektorkarte von pUHD10-3 GAD65s.

Vorgesehen war, die Tetrazykin-aktivierten Vektoren zur zellspezifischen Suppression der GAD Expression in primären Beta-Zellen des endokrinen Pankreas des Menschen zu verwenden. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten jedoch nur Vektorkonstrukte gewonnen werden, ohne diese für die Etablierung stabiler Zelllinien zu verwenden.

7. Diskussion

Im Mittelpunkt der Untersuchungen von Yoon stand die Generierung von transgenen NOD-Mäusen, in denen beide GAD Isoformen durch stabil transkribierte antisense GAD mRNA funktionell ausgeschaltet waren [163]. Die NOD-Mäuse, welche eine komplette Suppression beider GAD Isoformen in den Beta-Zellen des endokrinen Pankreas zeigten, waren vor der Entwicklung eines Diabetes geschützt. Im Gegensatz hierzu wurden solche Tiere diabetisch, welche das antisense Transgen nur gering bzw. ein Kontroll Transgen exprimierten. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer Modellzelllinie mit supprimierter Expression beider GAD Isoformen. Für diese Arbeit wurden INS-1 Zellen gewählt, da sie hoch differenziert sind. Die Morphologie von INS-1 Zellen gleicht derjenigen von primären Beta-Zellen der Ratte. Zudem bleiben diese Zellen über viele Passagen (ca. 80) stabil und ändern ihre Charakteristika nicht [5].

7.1. Entwicklung und Optimierung von gentechnologischen Verfahren zur Verminderung der GAD65 Expression in INS-1 Zellen

7.1.1. Suppression der GAD65 Expression durch RNA-Interferenz (siRNA) in INS-1 Beta-Zellen

Ein alternativer Ansatz für die Generierung GAD-supprimierter transplantierbarer Beta-Zellen mit erhaltener Transplantatfunktion könnte möglicherweise die Anwendung von RNA-Interferenz sein. Durch kurze, Sequenz-spezifische, doppelsträngige RNA Oligonukleotide (Duplexe von 21-Nukleotid RNAs mit 2-deoxythymidin 3'Überhängen) wird die Degradation homologer mRNA eingeleitet und auf diese Weise die Synthese des entsprechenden Proteins spezifisch inhibiert. Elbashir und Mitarbeiter zeigten, dass in Säugerzellen durch kurze Interferenz RNAs eine effektive und spezifische Reduktion/Inhibition der Expression hervorgerufen werden kann [42]. Diese Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Expression des Autoantigens GAD65 funktionell zu supprimieren. INS-1 Zellen werden mit spezifischen siRNAs gegen GAD65 transfiziert. Anhand der RT-PCR ist zu erkennen, dass die eingesetzten GAD65 siRNAs spezifisch wirken, indem sie die GAD65 mRNA reduzieren (s. 6.2.1.1., Abbildung 7). INS-1 Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden (sense und antisense) und Mock transfiziert werden, hatten keinen Einfluss auf die Suppression. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass eine

selektive Inhibition der GAD65 Expression durch RNA-Interferenz möglich scheint. Der große Nachteil von siRNAs ist die transiente Wirkung.

7.1.2. Suppression der GAD65 Expression durch antisense mRNA in INS-1 Beta-Zellen

Als eine weitere Möglichkeit zur Repression der GAD65 Expression sollte die Wirkung von antisense Transkripten untersucht werden. Diese zweite 'Suppressions-Strategie', die hier ihre Anwendung fand, setzt die stabile Transfektion von INS-1 Zellen voraus. Durch die stabile Transfektion der INS-1 Zellen mit dem antisense Konstrukt pcDNA3.1⁺GAD65 konnte eine GAD65-defiziente Zelllinie etabliert werden. Auf der mRNA Ebene durch spezifische RT-PCR konnte die Expression einer GAD65 antisense mRNA in einem Umfang detektiert werden, die ausgereicht hat, die Expression der endogenen GAD65 mRNA nahezu vollständig zu supprimieren (s. 6.2.3.1., Abbildung 9). Dabei erwächst die Frage der Spezifität eines antisense Ansatzes. Ist es möglich, dass nur die gewünschte mRNA hybridisiert oder führt eine Bindung an ähnliche RNA-Moleküle zu unerwünschten, unspezifischen Effekten? Diese Möglichkeit lässt sich höchstwahrscheinlich ausgrenzen, wenn gezeigt werden kann, dass Transkripte mit hoher Homologie zu dem Zielgen nicht betroffen sind, also nicht supprimiert werden. Die GAD65 (Accession Nr.: M72422) besitzt zu GAD67 (Accession Nr.: M76177), der zweiten GAD Isoform, eine hohe Homologie. Trotz der sehr hohen Homologie von GAD65 zu GAD67 wurde für die Anwendung in der Reversen Transkription, ein GAD65-spezifischer Primer ausgewählt, dessen Sequenz nicht homolog ist, mit der von GAD67. Somit ist eine unspezifische Suppression anderer Transkripte eher unwahrscheinlich. Das effektivste Verfahren zur Suppression der GAD65 Expression war die Etablierung einer stabilen GAD65-defizienten INS-1 Zelllinie. Folglich könnte dieses Verfahren als Strategie für die Generierung GAD-supprimierter transplantierbarer Beta-Zellen mit erhaltener Transplantatfunktion dienen. Als nächstes müsste ein Zellklon etabliert werden mit gleichzeitiger Suppression von GAD65 und GAD67. Dies war bis zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung Suppression der GAD Expression durch antisense mRNA wäre die Anwendung des Tet-Systems. Dieses induzierbare System eignet sich möglicherweise zur regulierbaren Expression von Transgenen (GAD65 antisense und GAD67 antisense) in INS-1 Zellen. Die Effizienz des Einbaus der transfizierten DNA ins Genom ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. So

werden bei der zellulären Rekombination möglicherweise nicht alle im Zellkern vorliegenden DNA Konstrukte ins Genom übernommen. Des Weiteren kann nicht gewährleistet werden, dass bei jeder Rekombination das gesamte Konstrukt (Transgen und Resistenzmarker) langfristig stabil ins Genom aufgenommen wird. Somit sollte die detektierbare Expression des Zielgens nicht nach Passagieren der Zellen abnehmen. Außerdem ist der genomische Locus der Insertion zufällig. Das bedeutet, dass wahrscheinlich lebenswichtige Gene der Zelle inaktiviert werden, was zum Absterben dieser Zelle und dem Verlust dieses Zellklons führt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Linearisierung des Plasmids, welche für den Einbau ins Genom notwendig ist. Die Linearisierung wird an einer zufälligen Stelle im Plasmid vorgenommen und kann somit auch essenzielle Sequenzbereiche treffen. Die Transfizierbarkeit der Zellen muss ebenfalls berücksichtigt werden.

7.2. Charakterisierung von INS-1 Zellen mit verminderter GAD65 Expression

7.2.1. Pankreatische Beta-Zell-spezifische Genexpression in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen

Zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 ist neben der Transplantation des kompletten Pankreas die Inselzelltransplantation eine Möglichkeit, die derzeit intensiv untersucht wird. Die transplantierbaren Inselzellen sollten den natürlichen Beta-Zellen funktionell möglichst ähnlich sein. Aus diesem Grund müssen mehrere Anforderungen erfüllt werden:

- a) Die potenziellen Beta-Ersatzzellen sollten GLUT2 und Glukokinase exprimieren.
- b) Sie müssen physiologisch auf einen Glukosereiz reagieren.
- c) Die nötigen Enzyme zur Prozessierung des Insulins aus dem Präprohormon besitzen.
- d) Zur Speicherung des Insulins sollen Granula gebildet werden können.

An GAD65-supprimierten INS-1 Zellen sollte untersucht werden, ob es zu einer veränderten Expression von Beta-Zell-Genen kommt. Neben Insulin, sind GLUT2 und Glukokinase Beta-Zell-Gene, deren Transkription durch PDX-1 gesteuert wird. Für die mRNA dieser Gene konnte gezeigt werden, dass sie unbeeinflusst von der Suppression der GAD65 in endokrinen pankreatischen INS-1 Zellen sind. Gleiches gilt auch für das Expressionsverhalten der Nkx6.1 mRNA (s. 6.2.4.1., Abbildungen 10–14). Die unveränderten Expressionsniveaus von Insulin, GLUT2 und Glukokinase könnten somit als Folge einer unveränderten Expression von PDX-1 sein. Das Gen PDX-1 auch STF-1,

IDX1 oder IPF-1 genannt, wurde ursprünglich als ein die Insulintranskription regulierendes Gen entdeckt. Es gehört zu den *Homeo Box* Transkriptionsfaktoren und ist für die Pankreasgenese notwendig. Menschen oder Mäuse, die homozygot für einen Defekt im PDX-1 Gen sind, sind apankreatisch. In der späteren Entwicklung sind Expression und Aktivität von PDX-1 auf die insulinproduzierenden Beta-Zellen beschränkt. Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 stammt aus der heterologen Gruppe der *NK Homeo Box* Gene. Die Expression von Nkx6.1 findet sich hauptsächlich in Beta-Zellen [65, 154]. In der *knock-out*-Situation bleibt deren endgültige Differenzierung aus. Glukokinase fungiert in Kombination mit GLUT2 als 'Glukose-Sensor' der Beta-Zelle. Glukose wird über den Glukosetransporter GLUT2 in die Beta-Zelle aufgenommen und intrazellulär durch Glukokinase verstoffwechselt. Dieser erste Schritt der Glykolyse wird durch das Enzym Glukokinase katalysiert. Gewebespezifische Promotoren und differenzielles Splicen ermöglichen eine unterschiedliche Expression des Gens in Leber und Pankreas.

7.2.2. Glukose-induzierte Insulinsekretion in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen

Eine wesentliche Aussagekraft zur Beurteilung der Funktion von potenziellen Beta-Ersatzzellen hat die Glukose-induzierte Insulinsekretion.

Durch die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion in INS-1 Zellen mittels physiologischer Glukosekonzentrationen stellen diese Zellen ein ideales Modell zur Untersuchung der Insulinsekretion in pankreatischen Beta-Zellen dar. Anstelle von Glukose ist auch die Stimulation mit Aminosäuren, Fettsäuren, Glukagon oder Adrenalin und einigen anderen Stoffen möglich. Glukose stimuliert die Insulinsekretion nicht über eine Bindung an Rezeptoren, sondern indem sie in die Zelle mittels eines Transportproteins (GLUT2) aufgenommen wird und dort metabolisiert wird. Dadurch verändert sich das intrazelluläre Verhältnis zwischen ATP und ADP, der ATP-abhängige K^+ -Kanal wird geschlossen und es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran. Als Folge öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und der dadurch bedingte Ca^{2+} -Einstrom vermittelt über noch unbekannte Mechanismen die Exozytose der Insulingranula [105, 119, 157]. Auf die Beta-Zelle selbst übt Insulin eine autokrine Stimulation aus. Dies führt über eine gesteigerte Insulingentranskription zum Anstieg der Insulinbiosynthese.

Die Messungen der sekretorischen Kapazität ergab für die GAD65-supprimierten INS-1 Zellklonen und die Kontrollzellen keine deutlichen Unterschiede. Gewählt wurde die Darstellung als Sekretion des Insulins im Zellkulturüberstand. Wie in der Abbildung 15 deutlich wird, zeigten sich alle Zelllinien auf Glukose gut stimulierbar. Wurden die Zelllinien mit steigenden Glukosekonzentrationen von 2,25–18 mM stimuliert, so konnte ein Anstieg der Insulinsekretion bis zu einer Glukosekonzentration von 11 mM Glukose gemessen werden. Im Vergleich dazu findet man bei höheren Glukosekonzentrationen (18 mM) einen Rückgang der Insulinsekretion. Im Gegensatz zu den Versuchsreihen mit hohen Glukosekonzentrationen zeigen sich bei den Untersuchungen mit einer 2,25 und 5,6 mM Glukosestimulation keine Unterschiede zwischen Mock und GAD65 antisense Zellen. Das Sekretionsprofil der beiden Zelllinien GAD65 sense und GAD65 antisense verhält sich bei einer Stimulation zwischen 5,6 und 18 mM Glukose ähnlich.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass im Zellkulturmodell INS-1 Zellen unter dem Einfluss einer GAD65 Suppression ihre spezifische Funktion der Insulinproduktion und -sekretion nicht verlieren.

7.2.3. Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose ist erhalten in GAD65-supprimierten INS-1 Zellen

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein gezielter Untergang bestimmter unerwünschter oder geschädigter Zellen und zusammen mit der Proliferation ein normaler physiologischer Vorgang zur Konstanterhaltung der Zellzahl. Nach Rabinovitch und Suarez-Pinzon [111] ist Diabetes das Ergebnis einer fehlerhaften Steuerung der Immunantwort, die zum Funktionsverlust und selektiver Zerstörung pankreatischer Beta-Zellen führt. *In vitro* Experimente, in denen Inseln verschiedener Mausstämme mit TNF α , IFN γ und Il1 β behandelt wurden, zeigten, dass diese drei Zytokine einzeln und synergistisch zytotoxisch für pankreatische Inselzellen wirkten und die Insulinsekretion der Beta-Zellen hemmen konnten, ein Effekt, der sich aufheben lässt, wenn die Zytokine entfernt werden. Dabei führen 200 U/ml TNF α und 200 U/ml IFN γ zu einer Abnahme der Glukose-stimulierten Insulinsekretion und zu geringen morphologischen Veränderungen in den Zellen, während 2000 U/ml der jeweiligen Zytokine zur DNA-Fragmentierung und Inselzerstörung führen. Die Todesliganden der TNF-Familie wie z. B. TNF, Fas-L und TRAIL spielen bei der Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle. Um die verschiedenen

Zytokine auf Apoptose-induzierende Effekte in einem *in vitro* System zu untersuchen, wurden die entsprechenden INS-1 Zelllinien verwendet. Die Abbildung 16A zeigt, dass nach einer Behandlung mit Kombinationen von zwei und drei Zytokinen eine geringe Steigung der Viabilität erfolgt im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Die Messungen der Zell-Viabilität an GAD65-supprimierte INS-1 Zellklone für die Doppelbehandlung (IFN γ +IL1 β) zeigten mit 75 % Viabilität einen geringen Anstieg im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (bei IFN γ : 81 %, bei IL1 β : 76 %). Hierfür wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Versuche zeigten keine Veränderung der Zytokin-induzierten Apoptose durch supprimierte GAD65 Expression in INS-1 Zellen. Inwieweit die Zytokinbehandlung von GAD65 antisense Zellen Ausdruck einer erhaltenen Sensitivität von GAD65-supprimierten INS-1 Zellen ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

Würde sich eine Resistenz gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose an GAD65-supprimierten INS-1 Zellklone abzeichnen, so wäre dies eine Perspektive zum besseren Schutz von Beta-Zellen, während der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 oder nach Transplantation vor einer Autoimmunzerstörung. Ferner könnte eine effiziente Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere von Wasserstoffperoxid, durch Glutathionperoxidase und Katalase von entscheidender Bedeutung sein, um einen optimalen Schutz insulinproduzierender Beta-Zellen vor einer Schädigung und Zerstörung durch freie Radikale und Zytokine zu generieren. Die Genexpression zytoprotektiver Enzyme in insulinproduzierenden Beta-Zellen könnte somit ein effektives Prinzip vor klassischen Beta-Zell-toxischen Wirkungen von Zytokinkombinationen darstellen.

7.3. Ausblick

Anhand der präsentierten Daten und Informationen aus der Literatur, ergibt sich ein recht deutliches Bild darüber, welche Rolle die Suppression der GAD65 Expression in INS-1 Zellen einnimmt. In der vorliegenden Arbeit, die sich mit der Suppression von GAD65 beschäftigt, konnte gezeigt werden, dass trotz forcierter Reduktion der Expression des Autoantigens GAD65, der Beta-Zell-Phänotyp, die Funktion insulinproduzierender Zellen und die Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose unverändert erhalten bleiben. Die aus diesem experimentellen Ansatz gewonnenen Erkenntnisse könnten, nach Überführung in das diabetische Tiermodell (NOD-Maus, BB-Ratte), als Voraussetzung für eine alternative Beta-Zell-Ersatztherapie [55] bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 dienen, um funktionsfähige Beta-Zellen zu generieren, die Einsatz in der Inselzelltransplantation finden. Jedoch muss für eine effektive Reduktion der Autoantigenität von transplantierten Pankreasinseln bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 die Expression beider Isoformen GAD65 und GAD67 in Beta-Zellen eliminiert werden [66, 163]. Der chronische eklatante Mangel an humanen Spenderorganen und die rückläufige Spenderbereitschaft erfordern es nach alternativen Quellen zur Generierung von Beta-Zellen oder Spenderspezies zu suchen. Ein weiteres Therapiekonzept ist die Regeneration von Beta-Zellen. Allerdings sind diese Mechanismen noch weitgehend ungeklärt.

7.4. Alternativen zur Generierung von funktionsfähigen insulinbildenden Zellen

Da der Diabetes, insbesondere der Typ 1 Diabetes, durch den Funktionsverlust der insulinproduzierenden Langerhans-Inseln hervorgerufen wird, liegt es nahe, diese zu ersetzen. Der Typ 1 Diabetes ist ein attraktiver Kandidat für Strategien zur Zellersatztherapie [40]. Im Prinzip verfolgt man fünf Forschungsansätze:

- Pankreastransplantation
- Inselzelltransplantation
- Regeneration von Beta-Zellen
- Gentherapie und den Einsatz von
- Stammzellen.

7.4.1. Pankreastransplantation

Die Transplantation des gesamten Pankreas wird angezeigt, wenn als Folge des Typ 1 Diabetes eine terminale Niereninsuffizienz zugleich auch eine Nierentransplantation erforderlich macht [83, 124]. In solchen Fällen werden Niere und Pankreas simultan verpflanzt. Dies erfordert eine lebenslange immunsuppressive Therapie, bestehend aus Cyclosporin A, Azathioprin und Glukokortikoiden, den herkömmlichen Immunsuppressiva. Bis Ende Dezember 2004 sind weltweit 23.043 Pankreastransplantationen durchgeführt worden, davon knapp 2.000 im Jahre 2003. Die 1-Jahrespatientenüberlebensrate lag bei 95 % für die kombinierte Transplantation von Niere und Pankreas (Transplantationszeitraum 2000 bis 2004). Die 1-Jahresfunktionsrate des transplantierten Pankreas betrug 85 % (Transplantationszeitraum 2000 bis 2004) [54, 63]. Diese Daten belegen, dass die Pankreastransplantation ein effektives und erfolgreiches etabliertes Verfahren zur Kontrolle des Glukosestoffwechsels ist. Ein Nachteil der Pankreastransplantation ist, dass das gesamte Organ transplantiert wird, obwohl für den Ersatz der endogenen Insulinproduktion lediglich die Langerhans-Inseln benötigt werden, die ca. 2 % der Organmasse betragen. Organspender sind die hirntoten Patienten, welche keine Pankreasverletzungen, keinen Diabetes und keine chronische Pankreatitis aufweisen. Wegen der sehr limitierten Anzahl Spenderorgane profitieren nur wenige Patienten von dieser Methode. Zudem ist sie chirurgisch-technisch höchst anspruchsvoll und daher nicht ohne Risiko für die Patienten.

7.4.2. Inselzelltransplantation

Eine alternative Methode ist die Übertragung isolierter humaner Langerhans-Inseln des Pankreas [95]. Nach Isolierung und Aufreinigung der Inseln werden diese über einen perkutanen Zugang intraportal über die Pfortader in die Leber appliziert [133]. Die Transplantation wird eventuell mehrmals wiederholt, bis genügend Zellen in der Leber Insulin produzieren und kein Insulin mehr gespritzt werden muss. Hier besteht das Problem vor allem im Mangel an Spenderorganen zur Isolierung der Inseln. Man benötigt in der Regel zwischen 1 und 4 Pankreata, um Insulinunabhängigkeit bei einem Patienten zu erreichen. Gegenüber der Pankreastransplantation ist die Inselzelltransplantation chirurgisch wesentlich leichter durchzuführen, da nur eine kleine Gewebemenge transplantiert wird. Die Lebensdauer der Spenderzellen in der Leber ist allerdings begrenzt, und nach einiger Zeit muss erneut exogen Insulin gespritzt werden. Wie bei jeder Organübertragung von einem Fremdspender ergibt sich das Problem der adaptiven Immunantwort gegen das transplantierte Gewebe. Zwar wird versucht, Spenderorgane mit einer größtmöglichen genetischen Übereinstimmung zu transplantieren, aber auch dann ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie erforderlich [64]. Die anfängliche Erfolgsrate der Inselzelltransplantation war jedoch nicht zufriedenstellend. Weniger als 10 % betrug die 1-Jahresfunktionsrate der transplantierten Inseln. Durch die Anwendung des sogenannten *Edmonton Protokolls* konnte die 1-Jahresfunktionsrate auf 80 % gesteigert werden [38, 95]. Die Gruppe um James Shapiro von der Universität Edmonton berichtete über sieben Patienten mit Typ 1 Diabetes, die nach einer Inselzelltransplantation über 4–15 Monate insulinfrei waren [134]. Der Erfolg dieses Therapieverfahrens beruhte im Wesentlichen auf der Erhöhung der transplantierten Inselzellzahl. Inseln von bis zu drei Spenderpankreaten werden auf einen Empfänger übertragen. Des Weiteren wird auf die Gabe einer steroid- und Cyclosporin A-haltigen immunsuppressiven Therapie verzichtet. Stattdessen wird ein niedriger Tacrolimuspiegel in Kombination mit Rapamycin (Sirolimus) nach Induktionstherapie mit einem monoklonalen Anti-Interleukin 2 Rezeptor-Antikörper (Daclizumab) verwendet [64, 83, 116]. So wird die Toxizität der Immunsuppressiva auf die transplantierten Inseln verringert, und damit eine bessere Transplantatvitalität erreicht. Die Leistung der transplantierten Inselzellen reichen aus, um die gefährlichen Hyperglykämien zu vermeiden. Damit erzielte man einen beachtlichen Teilerfolg in der Inselzelltransplantation, ohne jedoch eine vollständige Insulinunabhängigkeit zu erreichen. Von 1990 bis 2004 registrierte das Internationale

Inseltransplantationsregister weltweit 851 Inselzelltransplantationen bei Patienten mit Typ 1 Diabetes [122]. Aufwändige Studien zeigen, dass nach fünf Jahren die Funktionsrate der Inselzelltransplantate bei 80 % liegt, jedoch beträgt die Insulinunabhängigkeit nur noch 10 % [122].

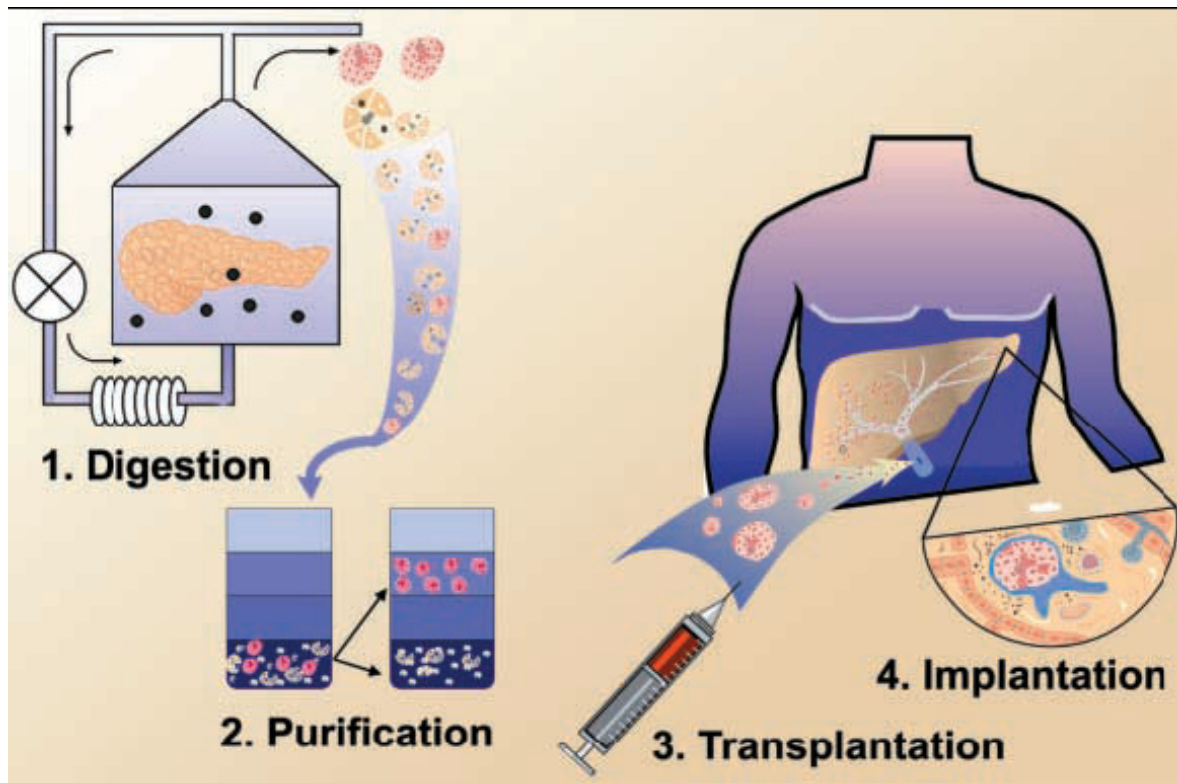


Abbildung 29: Indikation zur Inselzelltransplantation. Inselzellen werden aus dem Pankreas des Spenders durch Kollagenaseverdau isoliert und in die Pfortader des Empfängers infundiert. Von dort gelangen sie mit dem Blutstrom in die Leberkapillaren und nisten sich dort ein [130].

7.4.2.1. Das Schwein als Quelle für insulinproduzierende Zellen

Der große Bedarf an Spenderpankreatata ließe sich bei Ausdehnung der Indikation auf weitere Empfängergruppen nur noch durch xenogene Spenderorgane decken [75, 149]. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Physiologie, Organgröße und des Insulinmetabolismus bietet sich das Schwein als potenzielles Spendertier für klinische Xenotransplantationen an [95, 108, 152]. Das Schwein ist unbegrenzt verfügbar und sein Insulin unterscheidet sich nur in einer Aminosäure vom menschlichen Insulin. Bis vor wenigen Jahren wurde in der Insulinsubstitutionstherapie porcines Insulin eingesetzt; heute wird fast ausschließlich gentechnologisch modifiziertes Humaninsulin genutzt. Auch hier

besteht das Problem der Transplantatabstoßung von porzinen Inselzellen. Ein zentrales Problem der Xenotransplantation ist die mögliche Übertragung porziner Mikroorganismen, insbesondere porziner endogener Retroviren (PERV), auf den Transplantatrezipienten. Die Folgen derartiger Infektionen sind kaum vorhersehbar. PERV sind im Genom aller Schweine vorhanden und können humane Zelllinien *in vitro* sowie Mauszellen (NOD/SCID) *in vivo*, nach porziner Transplantation, infizieren [68, 152]. Detaillierte Analysen mit Untersuchungen der DNA von Empfängern porziner Inselzellen zeigten keinen Nachweis einer *in vivo* Infektion mit PERV beim Menschen [56]. Um die Gefahr der Übertragung von PERV nach der Xenotransplantation zu verringern, wurden die Grundlagen für einen Impfstoff gegen PERV geschaffen und mittels siRNA die Freisetzung von PERV aus Schweinezellen drastisch reduziert [68]. Vielleicht könnten durch diese Strategien die gegenwärtigen Bedenken aus virologischer Sicht beseitigt werden. Im Jahre 2005 berichtete eine mexikanische Arbeitsgruppe über die Behandlung junger Diabetiker mit porzinen Inselzellen anstelle von humanen Inselzellen [62]. Kürzlich wurde durch Übertragung von Inselzellen des Schweins eine erfolgreiche Behandlung bei diabeteskranken Affen erreicht [58, 114]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Xenotransplantation immer näher an die klinische Anwendung rückt.

7.4.2.2. Immunisolation als Lösung der Transplantatabstoßung

Eine attraktive Lösung stellt die Immunisolation bzw. die *in vitro* Vorbehandlung der zu transplantierenden Inseln dar; somit könnte die Immunogenität der zu transplantierenden Zellen reduziert werden. Eine Alternative besteht darin, die zu übertragenden insulinproduzierenden Zellen mit Hilfe einer semipermeablen Membran vom Immunsystem des Empfängers abzuschirmen, sodass die zellulären und humoralen (Antikörper und Komplementfaktoren) Bestandteile der Immunabwehr nicht mit dem Transplantat in Kontakt treten können. Die umgebende Membran – als Immunbarriere – muss jedoch für Nährstoffe und Insulin permeabel sein. Eine begleitende immunsuppressive Behandlung wäre damit nicht mehr notwendig. Eine weithin genutzte Immunisationsmethode ist die Mikroverkapselung mit Alginaten [108]. Erfolgversprechende *in vitro* und *in vivo* Versuche an diabetischen Ratten wurden 1980 von Lim und Mitarbeitern mit der Mikroverkapselung von Langerhans-Inseln durchgeführt. Zur Anwendung kamen Natriumalginat/Polylysin (ALG/PLL) Mikrokapselformen. Ulrichs konnte zeigen, dass bei diabetischen Ratten nach Transplantation von Alginat

verkapselten porzinen Inselzellen eine Normalisierung des Blutglukosespiegels über einen Zeitraum von über einem Jahr erreicht wurde, wobei keine immunsuppressive Therapie benötigt wurde [20, 150].

7.4.3. Regeneration von Beta-Zellen

Eine weitere Alternative zu den bestehenden Therapien des Diabetes Typ 1 könnte die Regeneration der Betazell-Funktion und -Masse sein. Patienten mit Typ 1 Diabetes haben meist noch wenige verbliebene insulinproduzierende Zellen, die der Zerstörung durch den Autoimmunprozess entgehen. Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ist ein Enzym, das zentral an der Signaltransduktion des aktivierten Insulinrezeptors beteiligt ist. Die Arbeiten von Mussmann zeigen eine Regeneration von Beta-Zellen. Die Deaktivierung der GSK3 durch RNA-Interferenz hatte zur Folge, dass die Replikation von INS-1 Zellen stimuliert wird. Zudem konnte dann auch gezeigt werden, dass an isolierten Beta-Zellen der Ratte durch GSK3 Hemmstoffe die Zellreplikation gesteigert wird. Die Ergebnisse dieser Studie machen berechtigte Hoffnung, dass GSK3 Hemmstoffe bei der Behandlung des Diabetes Typ 1 praktische Bedeutung erlangen [94]. Schwierig gestaltet sich dagegen das erneute Auftreten des Autoimmunprozesses, der zur Wiederkehr des Typ 1 Diabetes führt.

7.4.4. Gentherapie

Eine weitere Quelle für einen ständigen Nachschub an insulinproduzierenden Zellen könnte auch die Gentherapie sein. Sie ist definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu erzielen. Diese Methode würde das Problem der Fremdzellen- und Fremdgewebe-Transplantation umgehen. Um fremde DNA in Zellen einzubringen, stehen einige direkte, physikalische Transfertechniken (z. B. Elektroporation) zur Verfügung, die allerdings keine hohe Effizienz aufweisen. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass Makromoleküle, wie die DNA, in der Zelle in spezielle endosomale und lysosomale Vesikel aufgenommen und dort abgebaut werden. Virale Gentransfermethoden nutzen den viralen Infektionsmechanismus (z. B. durch Adenoviren, Herpesviren oder Retroviren), um genetische Information in Zielzellen einzuschleusen [37]. Ein derartiger viraler Vektor sollte eine hohe Effizienz beim Einbringen des Therapiegens in die Zielzellen aufweisen und eine regulierbare Genexpression zeigen. Zudem sollte er in seiner Herstellung einfach und reproduzierbar sein. Die Gentherapie des Diabetes Typ 1 umfasst

ein normalerweise nicht insulinproduzierendes Gewebe (Zellen), welches genetisch verändert wird. Die Leber eignet sich als ein potenzielles Ziel der Gentherapie, da dieses Organ, genau wie das Pankreas, auf Glukose reagiert und für die Glukosehomöostase verantwortlich ist [21]. Im Tierexperiment wurde durch *in vivo* Transfektionsansätze die experimentelle Basis zu einer Gentherapie erarbeitet. Versuche haben gezeigt, dass GIP-sezernierende K-Zellen des terminalen Ileums der Ratte und Hepatozyten von Ratten und Mäusen durch Transfektion mit den Insulin/Proinsulingen zur Sekretion von Insulin gebracht werden [21, 25, 79]. Des Weiteren ist es möglich, die Ausdifferenzierung von Hepatozyten so zu steuern, dass insulinproduzierende Zellen entstehen. Hierzu wurden Hepatozyten von Mäusen mit einem Adenovirus transfiziert, welches für das PDX1 Gen codiert [46]. Die klinische Anwendung der Gentherapie würde darin bestehen, dass man den Patienten körpereigene Zellen entnimmt und diese unter Kulturbedingungen vermehrt. Die Transfektion dieser Zellen mit dem Insulingen sollte die Produktion und Freisetzung von Insulin bewirken. Diese modifizierten Ersatzzellen werden dann reimplantiert. Für die Funktionsfähigkeit der insulinproduzierenden Ersatzzellen sind die Glukokinase und GLUT2 von entscheidender Bedeutung. Das glukosephosphorylierende Enzym Glukokinase und der Glukosetransporter GLUT2 sind zwei für die Glukose-induzierte Insulinsekretion wichtige Signalerkennungsstrukturen. Bisher ist es gelungen, humane Beta-Zellen retroviral zu transfizieren. Wenn diese Zellen in diabetische Mäuse transplantiert wurden, konnte eine Verbesserung bis Normalisierung des Blutzuckerspiegels beobachtet werden [96]. Abzuwarten bleibt, ob der Autoimmunprozess, der zur Entstehung des Typ 1 Diabetes geführt hat, nicht aktiv wird und die transplantierten Zellen abstößt.

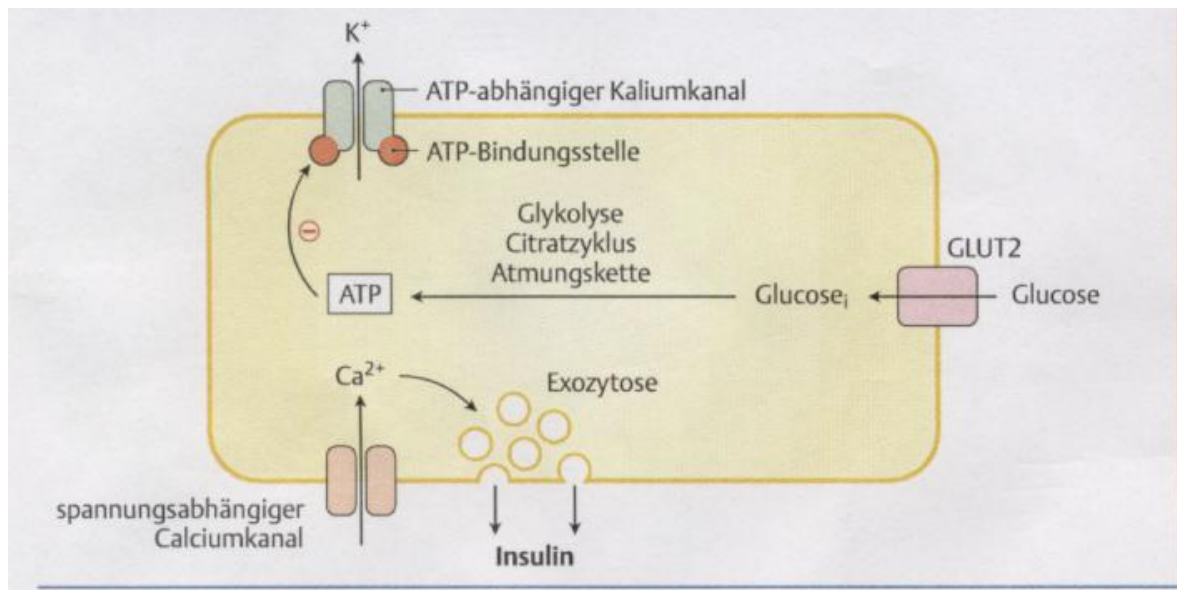


Abbildung 30: Mechanismus der Glukose-induzierten Insulinsekretion. Glukose wird über GLUT2 in die Beta-Zelle (wie auch in die Hepatozyten) aufgenommen und von der Glukokinase phosphoryliert [34].

7.4.5. Stammzellen

Eine weitere Möglichkeit, um die begrenzte Verfügbarkeit von insulinproduzierenden Zellen zu umgehen, ist der Einsatz von Stammzellen. Wenn man von Stammzellen spricht, muss man zunächst grob unterscheiden zwischen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und adulten Stammzellen [39].

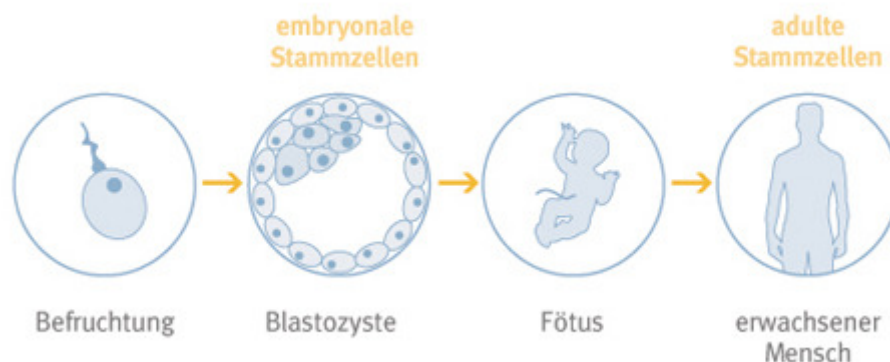


Abbildung 31: Stammzellen. Entwicklung vom befruchteten Ei zur Blastozyste und zum vollständigen Individuum (modifiziert nach [98]).

7.4.5.1. Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden aus Embryonen im Blastozystenstadium gewonnen. Die Blastozyste besteht aus der Blastozystenwand und der inneren Zellmasse, in der sich die ES-Zellen befinden [117]. Im Laufe der Ontogenese entwickelt sich daraus der eigentliche Embryo. Aufgrund ihrer hohen Telomeraseaktivität können sich ES-Zellen unbegrenzt teilen. Die Vermehrung der ES-Zellen erfolgt in einer Kulturschale. Gibt man geeignete Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedien hinzu, können unterschiedlichste Zell- und Gewebetypen heranreifen. Dieses Verfahren zur Gewinnung hoch aufgereinigter somatischer Zellpopulationen aus embryonalen Stammzellen nennt man gezielte Differenzierung.

Ein weiteres Verfahren ist die *Lineage* Selektion. Bei diesem Ansatz wird mittels zelltypspezifisch exprimierter selektierbarer Marker die gewünschte Population isoliert. Charakteristika der embryonalen Stammzellen sind die Pluripotenz, die nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit und das starke Proliferationspotenzial. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, an embryonalen Stammzellen, mittels homologer Rekombination jedes beliebige Gen zu ersetzen, zu inaktivieren oder zu modifizieren. Soria und Mitarbeitern ist es gelungen, insulinproduzierende Zellen aus murinen ES-Zellen zu gewinnen. Unter Anwendung der *Lineage* Selektion erfolgte die Transfektion der Zellen mit einem Konstrukt, welches ein Antibiotikaresistenzgen trägt, das unter der Kontrolle des humanen Insulinpromotors reguliert wird. Durch den Einbau des humanen Insulingens in das Konstrukt wurden die ES-Zellen so verändert, dass sich in der Zellkultur insulinproduzierende Zellen entwickelt haben, die in der Lage waren, Insulin in Abhängigkeit von Glukose, welches dem Kulturmedium zugesetzt wurde, zu sezernieren. In die Milz von hyperglykämischen Mäuse wurden ca. 10^6 ES-Zellen transplantiert, dies führte zu einer temporären Normalisierung des Glukosespiegels [138]. Lumelsky und Mitarbeiter bildeten auf ähnlicher Weise insulinproduzierende Zellen, die auf Glukosestimulation Insulin ins Zellkulturmedium abgeben. Durch gezielte Differenzierung gingen zunächst aus ES-Zellen neuronale Vorläuferzellen hervor, welche sich dann durch weitere Kultivierung zu insulinproduzierenden Zellen differenzierten. Jedoch wurde nach Transplantation in hyperglykämische Mäuse keine Normalisierung des Blutglukosespiegels beobachtet [85]. Es ist ebenfalls gelungen, aus humanen embryonalen Stammzellen insulinbildende Zellen herzustellen, die auf Glukosestimulation Insulin ins Zellkulturmedium abgaben [6]. Jedoch ist zu erwähnen, dass durch den Einsatz von

embryonalen Stammzellen, die Gefahr der Entwicklung von Tumoren (Teratomen) besteht. Noch fehlen Lösungen, um das Risiko der Teratombildung vollständig auszuschließen. Die Forschung an embryonalen Stammzellen und ihr klinischer Einsatz ist ethisch hoch umstritten und in Deutschland rechtlich stark eingeschränkt. Die Herstellung embryonaler Stammzellen ist in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz seit 1991 verboten. Der Bundestag hat im April 2002 – nach fast zweijähriger Debatte – das „Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher Stammzellen“ verabschiedet. Somit ist der Import embryonaler Stammzellen aus dem Ausland erlaubt. Allerdings nur in Ausnahmefällen und unter strengen Auflagen. Für die Forschung kann in Ausnahmefällen die Erlaubnis zur Einfuhr embryonaler Stammzellen erteilt werden, wenn mögliche Forschungsalternativen nicht das gleiche Ergebnis liefern und die ethische Vertretbarkeit des Forschungsvorhabens geprüft wurde. Es dürfen nur Stammzellen und Stammzelllinien eingeführt werden, die vor dem 1. Januar 2002 hergestellt wurden. Inzwischen wurden in Deutschland rund 20 Forschungsprojekte mit ES-Zellen genehmigt. Das Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin entscheidet über die Anträge auf Stammzellimport. Humane ES-Zellen werden in Deutschland von insgesamt elf Forschungsgruppen verwendet, die in vierzehn genehmigten Projekten tätig sind [115].

7.4.5.2. Adulte Stammzellen

Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen, sind adulte (auch somatische) Stammzellen im Organismus nach der Geburt (postnatales Stadium) vorhanden. Adulte Stammzellen sind zeitlebens im Körper vorhanden und regenerieren Gewebe. Es sind teilungsfähige Zellen von bereits ausgewachsenen Organismen, die in einer Vielzahl von Organen und Geweben nachgewiesen werden: z. B. Knochenmark, Gehirn, Epidermis, Blut, Leber, Haut, Auge, Darm, Bauchspeicheldrüse und Skelettmuskel. Ihre Aufgabe ist es, die unterschiedlichsten Arten von Ersatzzellen zu bilden. Nachteilig ist die im Gegensatz zu den ES-Zellen verminderte Telomeraseaktivität, die dazu führt, dass die adulten Stammzellen nur begrenzt expandierbar sind. Adulte Stammzellen haben in Zellkulturen ein deutlich eingeschränkteres Differenzierungspotenzial und ein geringeres Selbsterneuerungsvermögen als embryonale Stammzellen. So können sich neurale Stammzellen zu allen Zelltypen des Nervengewebes entwickeln, nicht aber zu Leber- oder Muskelzellen. Prinzipiell gibt es zwei Verfahren, um adulte Stammzellen aus dem Körper zu entnehmen. Bei der peripheren

Stammzellentnahme werden zuvor bestimmte Wachstumsfaktoren verabreicht. Dies führt zu einer Mobilisierung und Ausschwemmung der Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Bei der Knochenmarkentnahme, dem zweiten Verfahren, werden durch Punktionen des Beckenknochens die dort in hoher Konzentration vorkommenden Stammzellen gewonnen. Der Vorteil einer Knochenmarkentnahme ist, dass hierzu vorab keine Injektionen mit Wachstumsfaktoren notwendig ist. Allerdings sind die Punktionen des Beckenknochens schmerzhaft, sodass die Knochenmarkentnahme üblicherweise in Vollnarkose erfolgt. Es konnte experimentell bereits gezeigt werden, dass auch im Pankreas Zellen zu finden sind, aus denen sich *in vitro* Langerhans-Inseln ähnliche Strukturen entwickeln können, in denen Zellen vorhanden sind, welche Insulin bilden. Derartige Zellen wurden in NOD Mäuse transplantiert und führten zu einer Normoglykämie [112]. Nestin ist ein Marker für pankreatische Stammzellen. Dieses Intermediärfilament wird in unreifen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, und im Laufe der Differenzierung zu neuronalen Stammzellen wird die Expression von Nestin reduziert. Im Jahr 2000 berichtete Bonner-Weir, dass sich aus dem exokrinen humanem Pankreas von Inselzelltransplantationen, *in vitro* funktionale insulinproduzierende Zellen differenzieren. In der Immunhistochemie waren diese neuen Zellen für Insulin und PDX1 positiv. Zudem ließ sich in der Zellkultur eine Glukose-abhängige Insulinsekretion nachweisen [15]. Die adulten Stammzellen könnten dem Patienten selbst entnommen werden, sodass nach autologer Transplantation keine Abstoßung erfolgt, und die medikamentöse Immunsuppression überflüssig ist. Weltweit werden keine ethischen Bedenken gegen die Forschung mit menschlichen adulten Stammzellen erhoben, da durch sie kein lebender Organismus geschädigt wird.

Arznei der Zukunft?

Therapie mit embryonalen Stammzellen

1. Benötigt wird ein überschüssiger Embryo (etwa nach einer künstlichen Befruchtung) im frühen Stadium, der sich durch Zellteilung zu einer Blastozyste entwickelt.



Embryo im 4-Zell-Stadium



2. Im Innern der Blastozyste entsteht eine Masse aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).



3. Die ES-Zellen sollen in der Petrischale zu unterschiedlichsten Zelltypen heranreifen.



4. Diese könnten Patienten injiziert werden und krankes Gewebe reparieren.



Therapie mit adulten Stammzellen

1. Dem Körper eines Erwachsenen werden adulte Stammzellen entnommen, beispielsweise aus dem Knochenmark.



2. In Zellkulturen sollen sie umprogrammiert werden, so dass sie zu gewünschten Geweben heranreifen.



Zellbanken könnten Gewebe jeden Zelltyps auf Abruf bereithalten:



Blutzellen



Nervenzellen



Knochenzellen



Herzmuskelzellen



Leberzellen



Inselzellen



Hautzellen

Abbildung 32: Mögliche Anwendung von Stammzellen [139].

Welche der beschriebenen Therapieformen, Inselzelltransplantation, Regeneration von Beta-Zellen, Gentherapie und Stammzelltherapie sich als klinisch vorteilhaft und vor allem erfolgreich erweist, lässt sich gegenwärtig noch nicht beantworten. Es sind überwiegend Therapieformen, die sich noch in einem experimentellen Stadium befinden.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Alarcon C, Wicksteed B, Prentki M, Corkey BE, Rhodes CJ. Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. *Diabetes* 2002; **51**(8):2496-2504.
- [2] Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P. IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+) T lymphocytes. *J Clin Invest* 2000; **105**(4):459-468.
- [3] Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K. Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **229**(3):891-895.
- [4] Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**(12):6496-6499.
- [5] Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992; **130**(1):167-178.
- [6] Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; **50**(8):1691-1697.

- [7] Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; **331**(21):1428-1436.
- [8] Behrstock SP, Anantharam V, Thompson KW, Schweitzer ES, Tobin AJ. Conditionally-immortalized astrocytic cell line expresses GAD and secretes GABA under tetracycline regulation. *J Neurosci Res* 2000; **60**(3):302-310.
- [9] Berzins SP, Venanzi ES, Benoist C, Mathis D. T-cell compartments of prediabetic NOD mice. *Diabetes* 2003; **52**(2):327-334.
- [10] Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002; **51**(1):66-72.
- [11] Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; **10**(1):73-90.
- [12] Bond RW, Wyborski RJ, Gottlieb DI. Developmentally regulated expression of an exon containing a stop codon in the gene for glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(22):8771-8775.
- [13] Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E, Singh B. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 2001; **50**(11):2451-2458.

- [14] Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**(9):375-378.
- [15] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(14):7999-8004.
- [16] Borg H, Gottsater A, Fernlund P, Sundkvist G. A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes. *Diabetes* 2002; **51**(6):1754-1762.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
- [18] Brink C, Chowdhury K, Gruss P. Pax4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas. *Mech Dev* 2001; **100**(1):37-43.
- [19] Brunner GA, Balent B, Ellmerer M, Schaupp L, Siebenhofer A, Jendle JH, Okikawa J, Pieber TR. Dose-response relation of liquid aerosol inhaled insulin in type I diabetic patients. *Diabetologia* 2001; **44**(3):305-308.
- [20] Bundesministerium für Bildung und Forschung 2003
<http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de>
- [21] Burkhardt BR, Parker MJ, Zhang YC, Song S, Wasserfall CH, Atkinson MA. Glucose transporter-2 (GLUT2) promoter mediated transgenic insulin production reduces hyperglycemia in diabetic mice. *FEBS Lett* 2005; **579**(25):5759-5764.

- [22] Campbell SC, Cragg H, Elrick LJ, Macfarlane WM, Shennan KI, Docherty K. Inhibitory effect of pax4 on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett* 1999; **463**(1-2):53-57.
- [23] Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Bell E, Campbell D, Zhu Y, Young R, Trucco M, Markmann JF, Najj A, Wolf BA. Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting beta-cells. *Diabetes* 2003; **52**(9):2296-2303.
- [24] Chen G, Hohmeier HE, Gasa R, Tran VV, Newgard CB. Selection of insulinoma cell lines with resistance to interleukin-1beta- and gamma-interferon-induced cytotoxicity. *Diabetes* 2000; **49**(4):562-570.
- [25] Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfe MM, Kieffer TJ. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 2000; **290**(5498):1959-1962.
- [26] Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot HJ, Aagaard L, Begley K, Kofod H, Hejnaes K, Baekkeskov S. Pancreatic beta cells express two autoantigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-kDa hydrophilic form and a 64-kDa amphiphilic form which can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem* 1991; **266**(31):21257-21264.
- [27] Dahlquist G. Epidemiological studies of childhood insulin dependent diabetes. *Acta Paediatr Scand* 1991; **80**(6-7):583-589.

- [28] Darville MI, Ho YS, Eizirik DL. NF-kappaB is required for cytokine-induced manganese superoxide dismutase expression in insulin-producing cells. *Endocrinology* 2000; **141**(1):153-162.
- [29] Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999; **65**(5):535-542.
- [30] Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 1997; **138**(6):2610-2614.
- [31] Diabetes Epidemiology Research International Group. Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1988; **37**(8):1113-1119.
- [32] Dillin A. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(11):6289-6291.
- [33] Dohrmann C, Gruss P, Lemaire L. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 2000; **92**(1):47-54.
- [34] Duale Reihe, Biochemie, 2006 Georg Thieme Verlag KG.
- [35] Edelhoff S, Grubin CE, Karlsen AE, Alder DA, Foster D, Disteché CM, Lernmark A. Mapping of glutamic acid decarboxylase (GAD) genes. *Genomics* 1993; **17**(1):93-97.
- [36] Edlund H. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 2002; **3**(7):524-532.

- [37] Efrat S. Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998; **41**(12):1401-1409.
- [38] Efrat S. Cell replacement therapy for type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 2002; **8**(7):334-339.
- [39] Efrat S. Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes. *Isr Med Assoc J* 2004; **6**:265-267.
- [40] Efrat S. Generation of surrogate beta cells from tissue stem cells. *Curr Diab Rep.* 2004; **4**(4):298-303.
- [41] Eizirik DL, Darville MI. Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; **50 Suppl 1**:S64-S69.
- [42] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; **411**(6836):494-498.
- [43] Elsevier Ltd. Stevens & Lowe: Human Histology 3E.
- [44] Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 1991; **7**(1):91-100.
- [45] Faulkner-Jones BE, Cram DS, Kun J, Harrison LC. Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat. *Endocrinology* 1993; **133**(6):2962-2972.

- [46] Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000; **6**(5):568-572.
- [47] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**(6669):806-811.
- [48] Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol Rev* 1989; **111**:79-110.
- [49] Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 1976; **25**(7):595-603.
- [50] Geluk A, van Meijgaarden KE, Schloot NC, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Roep BO. HLA-DR binding analysis of peptides from islet antigens in IDDM. *Diabetes* 1998; **47**(10):1594-1601.
- [51] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(12):5547-5551.
- [52] Greeley SA, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H, Barker CF, Naji A, Noorchashm H. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Med* 2002; **8**(4):399-402.

- [53] Greening JE, Tree TI, Kotowicz KT, van Halteren AG, Roep BO, Klein NJ, Peakman M. Processing and presentation of the islet autoantigen GAD by vascular endothelial cells promotes transmigration of autoreactive T-cells. *Diabetes* 2003; **52**(3):717-725.
- [54] Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 2005; **19**(4):433-455.
- [55] Halban PA, Kahn SE, Lernmark A, Rhodes CJ. Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes* 2001; **50**(10):2181-2191.
- [56] Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 1998; **352**(9129):695-699.
- [57] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**(6805):770-776.
- [58] Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansite JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchoff N, Schuurman HJ. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006; **12**(3):301-303.

- [59] Higuchi Y, Herrera P, Muniesa P, Huarte J, Belin D, Ohashi P, Aichele P, Orci L, Vassalli JD, Vassalli P. Expression of a tumor necrosis factor α transgene in murine pancreatic β cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J Exp Med* 1992; **176**(6):1719-1731.
- [60] Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001; **7**(9):1052-1056.
- [61] Hoorens A, Pipeleers D. Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 1999; **42**(1):55-59.
- [62] Informationsdienst Wissenschaft 2005 <http://idw-online.de>
- [63] International Pancreas Transplant Registry 2004. IPTR, <http://www.iptr.umn.edu>
- [64] Jaeckel E, Becker T, Manns MP. Organtransplantation in der Endokrinologie. *Der Internist* 11 2004; **45**:1268-1280.
- [65] Jorgensen MC, Vestergaard PH, Ericson J, Madsen OD, Serup P. Cloning and DNA-binding properties of the rat pancreatic beta-cell-specific factor Nkx6.1. *FEBS Lett* 1999; **461**(3):287-294.
- [66] Jun HS, Khil LY, Yoon JW. Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**(11):1892-1901.

- [67] Jury K, Sohnlein P, Vogel M, Richter W. Isolation and functional characterization of recombinant GAD65 autoantibodies derived by IgG repertoire cloning from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; **50**(9):1976-1982.
- [68] Karlas A, Kurth R, Denner J. Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 2004; **325**:18-23.
- [69] Karlsten AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Distechi CM, Adler DA, Bartheimer H, Mathewes S, Grant FJ, Foster D. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(19):8337-8341.
- [70] Kash SF, Condie BG, Baekkeskov S. Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: lessons from knock-out mice. *Horm Metab Res* 1999; **31**(5):340-344.
- [71] Kaufman DL. Murder mysteries in type 1 diabetes. *Nat Med* 2003; **9**(2):161-162.
- [72] Kaufman DL, Tisch R, Sarvetnick N, Chatenoud L, Harrison LC, Haskins K, Quinn A, Sercarz E, Singh B, von Herrath M, Wegmann D, Wen L, Zekzer D. Report from the 1st International NOD Mouse T-Cell Workshop and the follow-up mini-workshop. *Diabetes* 2001; **50**(11):2459-2463.
- [73] Kay V, Bode J. Binding specificity of a nuclear scaffold: supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached-region DNA. *Biochemistry* 1994; **33**(1):367-374.

- [74] Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi Y, Fu Q, Rajotte R, Warnock G, Baekkeskov S. Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat, and mouse pancreatic islets. *Diabetes* 1993; **42**(12):1799-1808.
- [75] Krickhahn M, Meyer T, Bühler C, Thiede A, Ulrichs K. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant* 2001; **6**(3):48-54.
- [76] Laborjournal 2006 <http://www.laborjournal.de>
- [77] Lally FJ, Ratcliff H, Bone AJ. Apoptosis and disease progression in the spontaneously diabetic BB/S rat. *Diabetologia* 2001; **44**(3):320-324.
- [78] Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Tisch RM, Chen YH. Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**(9):2274-2278.
- [79] Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2000; **408**(6811):483-488.
- [80] Lee M, Han SO, Ko KS, Koh JJ, Park JS, Yoon JW, Kim SW. Repression of GAD autoantigen expression in pancreas beta-Cells by delivery of antisense plasmid/PEG-g-PLL complex. *Mol Ther* 2001; **4**(4):339-346.
- [81] Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978; **276**(5688):565-570.

- [82] Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; **193**(4251):415-417.
- [83] Liu EH, Herold KC. Transplantation of the islets of Langerhans: new hope for treatment of type 1 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**(9):379-382.
- [84] Lottmann H, Vanselow J, Hessabi B, Walther R. The Tet-On system transgenic mice: inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells. *J Mol Med* 2001; **79**(5-6):321-328.
- [85] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; **292**(5520):1389-1394.
- [86] Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Cena V, Soria B, Prentki M, Roche E. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 2003; **144**(1):335-345.
- [87] Magnuson MA, Shelton KD. An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* 1989; **264**(27):15936-15942.
- [88] Makhlof L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, Auchincloss H Jr, Sayegh MH. The role of autoimmunity in islet allograft destruction: major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet transplants after T-cell costimulatory blockade. *Diabetes* 2002; **51**(11):3202-3210.

- [89] Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 2001; **7**(8):899-905.
- [90] Michelsen BK, Petersen JS, Boel E, Moldrup A, Dyrberg T, Madsen OD. Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(19):8754-8758.
- [91] Millward BA, Alviggi L, Hoskins PJ, Johnston C, Heaton D, Bottazzo GF, Vergani D, Leslie RD, Pyke DA. Immune changes associated with insulin dependent diabetes may remit without causing the disease: a study in identical twins. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; **292**(6523):793-796.
- [92] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51**:263-273.
- [93] Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* 2002; **16**(6):859-863.
- [94] Mussmann R, Geese M, Harder F, Kegel S, Andag U, Lomow A, Burk U, Onichtchouk D, Dohrmann C, Austen M. Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2007; **282**(16):12030-12037.
- [95] Nanji SA, Shapiro AM. Advances in pancreatic islet transplantation in humans. *Diabetes Obes Metab* 2006; **8**:15-25.

- [96] Narushima M, Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka Y, Li SA, Chen Y, Miki A, Tanaka K, Nakaji S, Takei K, Gutierrez AS, Rivas-Carrillo JD, Navarro-Alvarez N, Jun HS, Westerman KA, Noguchi H, Lakey JR, Leboulch P, Tanaka N, Yoon JW. A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nat Biotechnol* 2005; **23**(10):1274-1282.
- [97] Naserke HE, Bonifacio E, Ziegler AG. Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(10):4826-4833.
- [98] National Institutes of Health <http://www.nih.gov/news/stemcell/primer.html>
- [99] Nepom GT, Lippolis JD, White FM, Masewicz S, Marto JA, Herman A, Luckey CJ, Falk B, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Nepom BS. Identification and modulation of a naturally processed T cell epitope from the diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(4):1763-1768.
- [100] Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002; **277**(46):43545-43548.
- [101] O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes* 1997; **46**(5):750-757.

- [102] Paliard X, De Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de Vries J, Spits H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN- γ by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 1988; **141**(3):849-855.
- [103] Paty BW, Ryan EA, Shapiro AM, Lakey JR, Robertson RP. Intrahepatic islet transplantation in type 1 diabetic patients does not restore hypoglycemic hormonal counterregulation or symptom recognition after insulin independence. *Diabetes* 2002; **51**(12):3428-3434.
- [104] Pedersen AA, Petersen HV, Videbaek N, Skak K, Michelsen BK. PDX-1 mediates glucose responsiveness of GAD(67), but not GAD(65), gene transcription in islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**(2):243-248.
- [105] Pereverzev A, Vajna R, Pfitzer G, Hescheler J, Klockner U, Schneider T. Reduction of insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1 by overexpression of a Ca(v)2.3 (alpha1E) calcium channel antisense cassette. *Eur J Endocrinol* 2002; **146**(6):881-889.
- [106] Petersen JS, Russel S, Marshall MO, Kofod H, Buschard K, Cambon N, Karlsen AE, Boel E, Hagopian WA, Hejnaes KR. Differential expression of glutamic acid decarboxylase in rat and human islets. *Diabetes* 1993; **42**(3):484-495.
- [107] Piemonti L, Leone BE, Nano R, Saccani A, Monti P, Maffi P, Bianchi G, Sica A, Peri G, Melzi R, Aldrighetti L, Secchi A, Di Carlo V, Allavena P, Bertuzzi F. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 2002; **51**(1):55-65.

- [108] Pollok JM, Lorenzen M, Kölln PA, Török É, Kaufmann PM, Kluth D, Bohuslavizki KH, Gundlach M, Rogiers X. In vitro Function of Islets of Langerhans Encapsulated with a Membrane of Porcine Chondrocytes for Immunoisolation. *Dig Surg* 2001; **18**:204-210.
- [109] Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; **14**(2):129-151.
- [110] Rabinovitch A, Skyler JS. Prevention of type 1 diabetes. *Med Clin North Am* 1998; **82**(4):739-755.
- [111] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1998; **55**(8):1139-1149.
- [112] Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; **6**(3):278-282.
- [113] Ritz-Laser B, Oberholzer J, Toso C, Brulhart MC, Zakrzewska K, Ris F, Bucher P, Morel P, Philippe J. Molecular detection of circulating beta-cells after islet transplantation. *Diabetes* 2002; **51**(3):557-561.
- [114] Robert Koch-Institut 2006 <http://www.rki.de>
- [115] Robert Koch-Institut 2007 <http://www.rki.de>
- [116] Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 2000; **23**(1):112-116.

- [117] Roche E, Ensenat-Waser R, Reig JA, Jones J, Leon-Quinto T, Soria B. Therapeutic potential of stem cells in diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 2006; **174**:147-167.
- [118] Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS. Genetic studies of late diabetic complications: the overlooked importance of diabetes duration before complication onset. *Diabetes* 2002; **51**(6):1655-1662.
- [119] Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 2000; **15**:72-77.
- [120] Rossini AA. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. *Diabetes* 2004; **53**(2):267-275.
- [121] Rubi B, Ishihara H, Hegardt FG, Wollheim CB, Maechler P. GAD65-mediated glutamate decarboxylation reduces glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2001; **276**(39):36391-36396.
- [122] Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; **54**(7):2060-2069.
- [123] Ryu S, Kodama S, Ryu K, Schoenfeld DA, Faustman DL. Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous beta cell function. *J Clin Invest* 2001; **108**(1):63-72.
- [124] Sachs DH, Bonner-Weir S. New islets from old. *Nat Med* 2000; **6**(3):250-251.
- [125] Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harb* 1989.

- [126] Scearce LM, Brestelli JE, McWeeney SK, Lee CS, Mazzarelli J, Pinney DF, Pizarro A, Stoeckert CJ Jr, Clifton SW, Permutt MA, Brown J, Melton DA, Kaestner KH. Functional genomics of the endocrine pancreas: the pancreas clone set and PancChip, new resources for diabetes research. *Diabetes* 2002; **51**(7):1997-2004.
- [127] Scherthaner G, Banatvala JE, Scherbaum W, Bryant J, Borkenstein M, Schober E, Mayr WR. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses, complement-fixing islet-cell antibodies, HLA DR antigens, and C-peptide secretion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1985; **2**(8456):630-632.
- [128] Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; **187**(8):1205-1213.
- [129] Schubeler D, Mielke C, Maass K, Bode J. Scaffold/matrix-attached regions act upon transcription in a context-dependent manner. *Biochemistry* 1996; **35**(34):11160-11169.
- [130] Schweizerische Ärztezeitung 2001; 82: Nr 8.
- [131] Seaquist ER, Damberg GS, Tkac I, Gruetter R. The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport/metabolism in humans. *Diabetes* 2001; **50**(10):2203-2209.

- [132] Serreze DV, Johnson EA, Chapman HD, Graser RT, Marron MP, DiLorenzo TP, Silveira P, Yoshimura Y, Nathenson SG, Joyce S. Autoreactive diabetogenic T-cells in NOD mice can efficiently expand from a greatly reduced precursor pool. *Diabetes* 2001; **50**(9):1992-2000.
- [133] Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ* 2001; **322**(7277):29-32.
- [134] Shapiro JAM, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; **343**(4):230-238.
- [135] Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Kozuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001; **7**(9):1057-1062.
- [136] Shi Y, Kanaani J, Menard-Rose V, Ma YH, Chang PY, Hanahan D, Tobin A, Grodsky G, Baekkeskov S. Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; **279**(3):E684-E694.
- [137] Skak K, Michelsen BK. The TATA-less rat GAD65 promoter can be activated by Sp1 through non-consensus elements. *Gene* 1999; **236**(2):231-241.

- [138] Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-Secreting Cells Derived From Embryonic Stem Cells Normalize Glycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes* 2000; **49**:157-162.
- [139] Spiegel online Wissenschaft 2004 <http://www.spiegel.de>
- [140] Steele C, Hagopian WA, Gitelman S, Masharani U, Cavaghan M, Rother KI, Donaldson D, Harlan DM, Bluestone J, Herold KC. Insulin secretion in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; **53**(2):426-433.
- [141] Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997; **15**(1):106-110.
- [142] Szabo G, Katarova Z, Kortvely E, Greenspan RJ, Urban Z. Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA Cell Biol* 1996; **15**(12):1081-1091.
- [143] Thiessen S, Serra P, Amrani A, Verdaguer J, Santamaria P. T-cell tolerance by dendritic cells and macrophages as a mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmune diabetes. *Diabetes* 2002; **51**(2):325-338.
- [144] Thomas MK, Devon ON, Lee JH, Peter A, Schlosser DA, Tenser MS, Habener JF. Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* 2001; **108**(2):319-329.

- [145] Tillakaratne NJ, Mouria M, Ziv NB, Roy RR, Edgerton VR, Tobin AJ. Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection. *J Neurosci Res* 2000; **60**(2):219-230.
- [146] Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; **85**(3):291-297.
- [147] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**(9):4350-4354.
- [148] Toyoda H, Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays* 1998; **20**(9):750-757.
- [149] Ulrichs K, Hamelmann W, Bühler C, Beutner U, Meyer T, Otto C, Klöck G, Thiede A. Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application. *Zentralbl Chir.* 1999; **124**(7):628-635.
- [150] Ulrichs K. Xenogeneic islet transplantation: Status of experimental transplantation 2007. *Xenotransplantation* 2007; **14**(4):370.
- [151] von Boehmer H, Sarukhan A. GAD, a single autoantigen for diabetes. *Science* 1999; **284**(5417):1183-1187.
- [152] van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000; **407**(6800):90-94.

- [153] Waldmann H. Transplantation tolerance-where do we stand? *Nat Med* 1999; **5**(11):1245-1248.
- [154] Watada H, Mirmira RG, Leung J, German MS. Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem* 2000; **275**(44):34224-34230.
- [155] Wiest-Ladenburger U, Fortnagel A, Richter W, Reimann J, Boehm BO. DNA vaccination with glutamic acid decarboxylase (GAD) generates a strong humoral immune response in BALB/c, C57BL/6, and in diabetes-prone NOD mice. *Horm Metab Res* 1998; **30**(10):605-609.
- [156] Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifiyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 2003; **9**(2):198-205.
- [157] Wollheim CB. Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia* 2000; **43**(3):265-277.
- [158] Wyborski RJ, Bond RW, Gottlieb DI. Characterization of a cDNA coding for rat glutamic acid decarboxylase. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; **8**(3):193-198.
- [159] Yanagawa Y, Kobayashi T, Kamei T, Ishii K, Nishijima M, Tabaku A, Tamura S. Structure and alternative promoters of the mouse glutamic acid decarboxylase 67 gene. *Biochem J* 1997; **326**(Pt2):573-578.

- [160] Yang Y, Bao M, Yoon JW. Intrinsic defects in the T-cell lineage results in natural killer T-cell deficiency and the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 2001; **50**(12):2691-2699.
- [161] Ye K, Malinina L, Patel DJ. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 2003; **426**(6968):874-878.
- [162] Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 1998; **27**(2):109-122.
- [163] Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 1999; **284**(5417):1183-1187.

9. Anhang

9.1. Abkürzungen

A	Adenin
Ab	<i>Antibody</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
as	<i>antisense</i>
BB	<i>Bio Breeding</i>
BETA2	<i>Beta Cell E Box Transactivator 2</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Bsd	Blastizidin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAPS	Zyklohexylaminopropansulfonsäure
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C/EBP	<i>CAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CHX	Zykloheximid
Da	Dalton
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOC	Natriumdesoxychololat
Dox	Doxyzyklin
ds	<i>double stranded</i>
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtBr	Ethidiumbromid
ETOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
G	Guanin
g	Gramm
GAD	Glutamatdecarboxylase
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIP	<i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLUT	Glukosetransporter
GSK	Glykogen Synthase Kinase
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
hi FBS	Hitze-inaktiviertes <i>Fetal Bovine Serum</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigene</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IAA	<i>Insulin Autoantibodies</i>

IAPP	<i>Islet Amyloid Polypeptide</i>
ICA	<i>Islet Cell Antibodies</i>
IDX	<i>Islet Duodenum Homeo Box</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin(e)
Il	Interleukin(e)
IPF	<i>Islet Promotor Factor</i>
IPTR	<i>International Pancreas Transplant Registry</i>
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRBH	Krebs Ringer Bicarbonat Hepes
l	Liter
LB	Luri Bertani
M	Molar
mAK	monoklonale(r) Antikörper
MAR	<i>Matrix Associated Region</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex</i> Moleküle der Klasse I
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex</i> Moleküle der Klasse II
min	Minute(n)
MIP	Maus Proinsulin Genpromotor
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn-SOD	Mangansuperoxiddismutase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEUROD	<i>Neurogenic Differentiation</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institut of Health</i>
NK	Natürliche Killerzelle(n)
Nkx	<i>NK Homeo Box</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>None Obese Diabetic</i>
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
p	pico
PANDER	<i>Pancreatic Derived Factor</i>
Pax	<i>Paired Box</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDX	<i>Pancreatic Duodenal Homeo Box</i>
PEG	Polyethylenglykol
PERV	porzine endogene Retroviren
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	rekombinant
Ra	Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotation per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
S	<i>sense</i>

s.	siehe
SAR	<i>Scaffold Attachment Region</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>single stranded</i>
STF	<i>Somatostatin Transcription Factor</i>
STZ	Streptozotozin
T	Thymin
TAE	Trishydroxymethylaminomethanacetatethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>(TNF) Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSR	<i>Template Suppression Reagent</i>
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
z. B.	zum Beispiel
Zyt	Zytokine

9.2. Publikationsliste

Kongressbeiträge:

1. Lazariotou, M., Siegmund, D., Wajant, H., Laubner, K., and Seufert, J. 2004. Beta-Zell-Phänotyp, Funktion und Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose sind erhalten in GAD-65 Autoantigen-supprimierten INS-1 Zellen.
Diabetes und Stoffwechsel (Suppl. 1):V-82
2. Lazariotou, M., Siegmund, D., Wajant, H., Laubner, K., Jakob, F., and Seufert, J. 2003. Beta-Zell-Phänotyp, Funktion und Sensitivität gegenüber Zytokin-induzierter Apoptose sind erhalten in GAD-65 Autoantigen-supprimierten INS-1 Zellen.
Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin 2004 ABS-1452-00121
3. Lazariotou, M., Siegmund, D., Wajant, H., Jakob, F., and Seufert, J. 2003. Unchanged pancreatic beta-cell phenotype, function and sensitivity to cytokine-induced apoptosis in GAD-65 autoantigen-suppressed INS-1 cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* ABS-3370-00243
4. Lazariotou, M., Nixdorf, S., Roller, J., Jakob, F., and Seufert, J. 2003. Suppression of the immunogenic potential of pancreatic beta-cells by genetic reduction of autoantigenic glutamic acid decarboxylase (GAD) expression. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 111 (Suppl. 1):S44
5. Seufert, J., Lazariotou, M., and Jakob, F. 2001. Suppression of the immunogenic potential of pancreatic beta-cells by genetic reduction of autoantigenic glutamic acid decarboxylase (GAD) expression. *7th German Pancreatic Islet Workshop, German Diabetes Association*
6. Fischbach, C., Seufert, J., Neubauer, M., Lazariotou, M., Göpferich, A., and Blunk, T. 2001. Towards a Three-Dimensional in vitro-Model of Adipogenesis. *Keystone Symposia 2001, Molecular Control of Adipogenesis and Obesity*

9.3. Lebenslauf

Maria Lazariotou

geboren am 09.03.1974 in Öhringen

Schulbildung

1980–1984	Grundschule Weißbach
1984–1990	Realschule Niedernhall
13. Juli 1990	Abschluss der Mittleren Reife
1990–1991	Griechisches Lyzeum Heilbronn
1991–1992	Griechisches Lyzeum Ludwigsburg
19. Mai 1992	Reifeprüfung

Studium

1992–1993	Studienkolleg an der Universität München
13. Juli 1993	Feststellungsprüfung
1993–2000	Studium der Biologie an der Universität Würzburg
1999–2000	Diplomarbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
28. Juli 2000	Abschluss: Diplom

Promotion

Oktober 2000–Dezember 2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
----------------------------	---

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Seit Oktober 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie
-------------------	--