

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Charakterisierung der Rolle des Proteins p8 in der  
proliferationsassoziierten Signaltransduktion in Insulin  
produzierenden beta-Zellen des endokrinen Pankreas**

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

**vorgelegt von**

**Lars Romfeld**

**aus Passau**

**Würzburg, September 2009**

**Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Sigrun Merger**

**Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Karin Ulrichs**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2010**

**Der Promovend ist Arzt.**

**Gewidmet  
Elisa Moosburger  
und  
Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Definition und Klassifikation	1
1.1.2	Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus Typ I	1
1.1.3	Pathogenese des Typ 1-Diabetes	2
1.1.4	Therapie des Diabetes mellitus	3
1.2	Molekulare Grundlagen der Regulation von Funktionen in der beta-Zelle des endokrinen Pankreas	7
1.2.1	Wachstumseinflüsse auf die beta-Zelle	7
1.2.2	Mitogene Signaltransduktionswege	8
1.3	Das Protein p8	13
1.4	Themenstellung	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Software	21
2.1.3	Chemikalien	21
2.1.4	Radioaktive Isotope	21
2.1.5	Enzyme und Laborkits	22
2.1.6	Puffer und Lösungen	22
2.1.7	Zellen	22
2.1.8	Medien	23
2.1.9	Plasmide	24
2.1.10	Wachstums- / Stimulationsfaktoren	24
2.1.11	Proteinaktivitätsinhibitoren	25
2.1.12	Größenmarker	25
2.1.13	Positivkontrollen	25
2.1.14	Antiserum	26

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Kultivierung von beta-Zellen des endokrinen Pankreas	27
2.2.2	Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	28
2.2.3	Stimulation der Zellen	29
2.2.4	Transfektion von Zellen	29
2.2.5	Extraktion von Gesamtzelllysaten	29
2.2.6	Das p8-exprimierende Plasmid	30
2.2.7	Proteinanalytische Methoden	31
2.2.8	Proliferationsnachweis mittels [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporation	38
2.2.9	Plasmidamplifikation in Escherichia coli	39
2.2.10	Plasmid-DNA-Aufreinigung	39
2.2.11	Restriktionsenzymverdau	40
2.2.12	RNA-Extraktion	41
2.2.13	DNA-Amplifikation mittels Reverse-Transkriptase-PCR ( RT-PCR )	41
2.2.14	Analyse von DNA in Agarosegelen	42

### **3 ERGEBNISSE** **44**

<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Zelllinie p8-INS-1</b>	<b>44</b>
3.1.1	Die Zelllinie INS-1 als Modell der beta-Zelle des endokrinen Pankreas	44
3.1.2	Das p8-überexprimierende Plasmid	44
3.1.3	Kontrolle der p8-Expression in p8-INS-1-Zellen	45
3.1.4	Protein p8 wird phosphoryliert	52
3.1.5	Protein p8 wird ubiquitiniert und unterliegt einem schnellen Abbau im Proteasom	53
3.1.6	Auswirkungen der p8-Überexpression auf das Proliferationsverhalten der p8-INS-1-Zellen	56
<b>3.2</b>	<b>p8-vermittelte Zellproliferation ([<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation)</b>	<b>59</b>
3.2.1	Identifikation von Wachstumsfaktoren der beta-Zelle im zugrundeliegenden Modell	59
3.2.2	p8 verstärkt die glukoseabhängige Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas	62
3.2.3	p8 verstärkt die IGF-1-abhängige Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas	63
3.2.4	p8 verstärkt die Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas unter Zugabe allgemeiner Wachstumsfaktoren	65

<b>3.3</b>	<b>p8 im Umfeld der proliferationsassoziierten Signaltransduktionswege der insulin- produzierenden beta-Zelle des endokrinen Pankreas</b>	<b>66</b>
3.3.1	Protein p8 bindet direkt an Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3'K)	66
3.3.2	Protein p8 bindet direkt an Proteinkinase C (PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	68
<b>3.4</b>	<b>Effekte inhibitorischer Phosphorylierung auf p8-vermittelte Zellproliferation</b>	<b>70</b>
3.4.1	PI3'K-Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation	71
3.4.2	p8 im Umfeld der Proteinkinase-C-Inhibition	72
3.4.3	p8 im Umfeld der Proteinkinase-A-Inhibition	75
3.4.4	p8 im Umfeld der p38 MAPK-Inhibition	76

## **4 DISKUSSION 78**

<b>4.1</b>	<b>p8 als Substrat diverser Wachstumsfaktoren und Stimulatoren</b>	<b>79</b>
<b>4.2</b>	<b>p8 als Schlüsselposition in der mitogenen Signaltransduktion der beta-Zelle des endokrinen Pankreas</b>	<b>81</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Rolle des Proteins p8 bei Tumorwachstum</b>	<b>84</b>

## **5 ZUSAMMENFASSUNG 87**

## **6 LITERATURVERZEICHNIS 90**

## **DANKSAGUNG**

## **CURRICULUM VITAE**

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Definition und Klassifikation

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel beruht. Dies führt in der Folge zu erhöhten Blutglukosewerten und somit auf Dauer zu umfassenden Schädigungen des Herz-Kreislauf- sowie des Nervensystems.

Laut WHO und ADA ( American Diabetes Association, 1997 ) unterteilt man in Typ 1- und Typ 2-Diabetes, sowie in Gestationsdiabetes und andere spezifische Formen, die überwiegend genetisch bedingt sind. Beim Typ 2-Diabetes geht man davon aus, dass hauptsächlich aufgrund von Bewegungsarmut bei gleichzeitiger Überernährung ein relativer Insulinmangel entsteht. Dieser kann entweder durch eine Erschöpfung der Insulinsekretion der beta-Zellen des endokrinen Pankreas oder durch eine Insulinresistenz in den peripheren Organsystemen bedingt sein. Dahingegen kommt es beim Typ 1-Diabetes durch autoimmune Prozesse zu einer Zerstörung der Langerhansschen Inseln und letztlich zu einem absoluten Insulinmangel [4, 5].

### 1.1.2 Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus Typ I

In Deutschland leben ungefähr 250.000 Typ 1-Diabetiker. Sie machen dabei 5% aller an Diabetes Erkrankten aus. Auffallend ist ein Nord-Süd-Gefälle in Europa mit deutlich mehr Typ 1-Diabetikern in den skandinavischen Ländern als in Mittel- und Südeuropa. Prinzipiell kann sich Typ 1-Diabetes in jedem Alter erstmals manifestieren. Vielfach treten erste klinische Symptome im Anschluss an Stresssituationen auf, wie z.B. bei schweren Infektionen oder Operationen (siehe auch: Deutsche Diabetes Gesellschaft 2004: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland) [6, 7].

### **1.1.3 Pathogenese des Typ 1-Diabetes**

#### **1.1.3.1 Genetische Prädisposition**

Der Entwicklung eines Typ 1-Diabetes liegt eine genetische Prädisposition zugrunde. Ein einzelner ursächlicher Defekt konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Allerdings ist seit längerem eine Korrelation mit bestimmten HLA-Mustern bekannt. So geht man von einem 4- bis 10-fach erhöhten Risiko aus, im Laufe seines Lebens zu erkranken, wenn HLA DR-3 und HLA DR-4 exprimiert werden, zumal bei 90-95% der Typ 1-Diabetiker dieser Gewebetyp vorliegt (im Gegensatz zu 50-60% der Allgemeinbevölkerung) [8, 9].

#### **1.1.3.2 Immunbedingte Zellzerstörung**

Durch autoimmun vermittelte Prozesse kommt es zur lokalen Entzündungsreaktion an den Inselzellen, einer sog. Insulitis. Welche Auslöser dafür verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings werden verschiedene Umweltfaktoren, Toxine und vor allem Virusinfektionen diskutiert (z.B. Coxsackie B4, Mumps, Röteln, Mononukleose) [10].

Die Entzündungsreaktion wird sowohl durch zelluläre Immunreaktion als auch durch Autoantikörper vermittelt. Diese Antikörper lassen sich bereits bei noch normalen Blutzuckerspiegeln nachweisen. Man findet dabei unter Umständen Autoantikörper gegen Inselzellen (ICA = islet cell antibodies), die im Speziellen gegen Glutaminsäuredecarboxylase (GAD65) oder Tyrosin-Phosphatase (IA-2) gerichtet sind. Weiterhin feststellbar sind Insulin- und Proinsulin-Autoantikörper (IAA bzw. PIAA), Antikörper gegen Inselzelloberflächen (ICSA = islet cell surface antibodies) und Anti-64kD-Protein-Antikörper gegen Membranproteine der beta-Zelle. Im Verlauf der Jahre sinkt die Nachweisbarkeit der Antikörper z.T. unter die Nachweisgrenze, da der Immunprozess immer mehr „ausbrennt“ [11-15].

Man weiß mittlerweile, dass der Erkrankung meist eine gewisse Vorphase (Prä-Typ 1-Diabetes) vorausgeht, in der es mit schubförmigem oder progredientem Verlauf zum Untergang der Langerhansschen Inselzellen kommt. In der Folge lässt die



Insulinsekretion allmählich nach und führt stetig zu einem Blutzuckeranstieg. In dieser Anfangsphase lassen sich bereits verschiedene Antikörper als Zeichen des Autoimmunprozesses nachweisen. Klinisch äußert sich ein Typ 1-Diabetes allerdings erst ab einem Verlust von ca. 80% der insulinproduzierenden Zellen, dann aber meist dramatisch mit Polyurie, Polydypsie, Exsikkose, Inappetenz, Gewichtsverlust und Kräfteverfall [4, 5, 16].

Unter Therapie beobachtet man häufig eine Remissionsphase. Bedingt durch die chronisch hohen Blutzuckerspiegel wird die Insulinausschüttung gehemmt. Durch therapeutische Normalisierung des Blutzuckerspiegels kommt es vorübergehend zu einer gesteigerten Insulinsekretion der noch intakten Inselzellen. Dieses auch als „Honeymoonphase“ bezeichnete Phänomen erkennt man am verminderten Bedarf an exogener Insulinzufuhr. Unvermeidlich kommt es jedoch nach Monaten zu einem Versagen der beta-Zellen und die Funktion der insulinproduzierenden beta-Zelle des endokrinen Pankreas erlischt.

Auffallenderweise können bei Typ 1-Diabetikern häufig verschiedene Antikörper nachgewiesen werden, die sich gegen weitere endokrine Organe wie z.B. Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebennieren usw. richten. Die autoimmune Entgleisung stellt somit keine Gewebsspezifität gegenüber der Bauchspeicheldrüse dar. So findet man viele Erkrankungen, die aufgrund dieser Sachlage mit einem Typ 1-Diabetes kombiniert auftreten. Zu nennen wären dabei z.B. Morbus Addison, Hashimoto-Thyreoditis, Morbus Basedow, Hypoparathyreodismus, Vitiligo, Hypogonadismus, Alopezie oder perniziöse Anämie [4].

### **1.1.4 Therapie des Diabetes mellitus**

Ausgehend von erhöhten Blutzuckerspiegeln kommt es zur endogenen Glykation, also der nicht enzymatisch vermittelten Bindung von Kohlenhydratgruppen an Proteine und Lipide der verschiedensten Körperzellen. Diese „Verzuckerung“ führt in der Summe zu massiven Komplikationen, die später nicht mehr beherrschbar sind und lebensbedrohlich werden können. Im Vordergrund stehen dabei Mikro- und Makroangiopathien, Neuropathien, Retinopathien und Nephropathien. Neben derlei

Folgeschäden können zudem Stoffwechsellentgleisungen wie ein hyperosmolares nicht-ketotisches Syndrom („hyperosmolares Koma“) oder die diabetische Ketoazidose („ketoazidotisches Koma“) ausgelöst werden [4, 17]. Eine geeignete Therapie muss deshalb auf die Normalisierung des Blutzuckerspiegels abzielen. Dies versucht man entweder mit Insulinsubstitution oder mit der Transplantation neuer insulinproduzierender Zellen zu erreichen. Durch die Einstellung des Blutzuckerspiegels auf einen fast normalen Bereich können die Entwicklung und das Voranschreiten von Komplikationen verhindert bzw. verzögert werden [18].

Einer der wichtigsten Parameter zur Einschätzung des Therapieerfolges stellt der sog. HbA<sub>1c</sub>-Wert dar. Es handelt sich dabei um den prozentualen Anteil des glykosylierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin und spiegelt die Blutzuckerspiegel der letzten 6-8 Wochen wider. Der Normwert beträgt ca. 4,0-6,2 % des Gesamthämoglobins.

### **1.1.4.1 Insulintherapie**

Bei der konventionellen Insulintherapie wird jeweils morgens und abends (meist zu den Mahlzeiten) eine Mischung aus Normal- und Verzögerungsinsulin injiziert. Diese Therapieform ist nur bei geregelter Tagesablauf und stabiler Stoffwechsellage geeignet.

Alternativ verfolgt man eine intensivierete konventionelle Insulintherapie. Dieses Therapieschema der Insulinsubstitution fordert eine intensive Patientenschulung und die Mitarbeit des Patienten hinsichtlich mehrerer Insulininjektionen und somit auch häufigeren Blutzuckerkontrollen. Dem Ganzen liegt ein Basis-Bolus-Konzept zugrunde, d.h. der Patient deckt seinen Basalbedarf mittels eines Verzögerungsinsulins ab und orientiert sich bei den Mahlzeiten an der geplanten Kohlenhydrataufnahme sowie dem gemessenen Blutzuckerspiegel. Dementsprechend wird ein Normalinsulin als Bolus substituiert.

Beim Insulinersatz mittels Insulinpumpe gibt eine kleine tragbare Pumpe über einen subkutan gelegenen Katheter kontinuierlich Normalinsulin ab. Die Basaldosis kann dabei entsprechend den individuellen Tagesschwankungen unterschiedlich programmiert werden, sodass gleichmäßige, normwertige Blutzuckerspiegel erreicht

werden können. Darüberhinaus kann der Patient vor Mahlzeiten zusätzliche Insulindosen über die Pumpe infundieren lassen. Gerade Patienten, die häufig Hypoglykämien erleiden, Langzeitdiabetiker mit stark schwankenden Blutzuckerspiegeln und vor allem Schwangere stellen eine geeignete Anwendergruppe dar. Unabdingbare Voraussetzungen sind auch hier intensive Patientenschulung, Motivation und Zuverlässigkeit bezüglich regelmäßiger Blutzuckerkontrollen [4].

### **1.1.4.2 Pankreastransplantation**

Die Pankreastransplantation scheint auf den ersten Blick in der Lage, einen Typ 1-Diabetiker zu heilen, birgt aber gleichzeitig einige Risiken. Es gibt nicht nur, wie in vielen anderen Bereichen der Transplantationsmedizin, zu wenige Spenderorgane, sondern die Patienten müssen auch zwingend immunsupprimiert werden, um eine Abstoßung zu vermeiden, was dennoch in nahezu der Hälfte der Fälle nicht zu verhindern ist. Die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva verursachen darüberhinaus meist schlimmere Probleme als der Diabetes an sich. Ungefähr 10-20% der Patienten sterben innerhalb eines Jahres nach Pankreastransplantation. Deshalb wird die Indikation für eine Transplantation sehr eng gestellt, und im Grunde werden nur Typ 1-Diabetiker mit terminaler Niereninsuffizienz behandelt, da der Nutzen das Risiko hierbei überwiegt. Dazu kommt, dass Pankreasgewebe, welches zusammen mit der Niere eines geeigneten Spenders transplantiert wird, weniger häufig abgestoßen wird [4].

### **1.1.4.3 Inselzelltransplantation**

Um Inselzellen des Pankreas transplantieren zu können ist die Isolation des Spendergewebes notwendig. Hierzu wird exokrines von endokrinem Gewebe des Pankreas mittels Kollagenaseverdauung getrennt. Anschließend reinigt man die freigewordenen Inseln vom exokrinen Gewebe mittels einer Dichtegradientenzentrifugation auf. Bei foetalem Gewebe ist dieses Verfahren im Vergleich zu adultem Gewebe aufgrund des geringeren exokrinen Anteils weit weniger problematisch, wobei

nur wenig foetales Gewebe zur Verfügung steht und auch ethische Grundsätze keinesfalls vernachlässigt werden dürfen. Geringere Abstoßungsreaktionen und Erhalt der Wachstumsfähigkeit sind weitere Vorteile foetalen Inselgewebes. Im Rahmen der Transplantation wird nun dieses Inselgewebe via Pfortader in die Leber verbracht, somit ist keine größere chirurgische Intervention notwendig [19]. An sich stellt die Inseltransplantation somit ein recht probates Verfahren dar, birgt aber dennoch Abstoßungsrisiken und fordert postinterventionell eine lebenslange Immunsuppression der Patienten. Große Fortschritte zur Sicherung eines langfristigen Überlebens und der Funktion des Transplantats konnten durch die Anwendung des sog. „Edmonton-Protokolls“ erzielt werden. Hierin werden Optimierungsstrategien in der Isolierung von Inselzellen aber auch die Verwendung von Immunsuppressiva (steroidfreie Immunsuppression, Sirolimus, Tacrolimus, Daclizumab) mit geringerer Toxizität auf die beta-Zelle beschrieben [20]. Um dieser Anwendung gerecht zu werden, werden aber mindestens zwei Spenderorgane benötigt, somit limitiert der verbreitete Spendermangel die Verfügbarkeit für die überwiegende Zahl der Diabetiker. Daher besteht ein großes Interesse an alternativen Strategien zur Generierung reichhaltiger Ressourcen für beta-Zellen bzw. ihren Äquivalenten [21]. In neuerer Zeit rückt dabei auch die Xenotransplantation wie zum Beispiel von Pankreasinseln des Schweins zunehmend in den Vordergrund. Dabei stellen die Akutabstoßung als auch eine mögliche Infektion mit PERV („porcine endogenous retrovirus“) [22] noch zu überwindende Barrieren dar. Im Focus der Untersuchungen steht beispielsweise die Mikroverkapselung der Inselzellen, um diese vor der Immunabwehr des Empfängers und damit vor der Abstoßung zu schützen, was eine immunsuppressive Therapie überflüssig machen würde [23, 24].

#### **1.1.4.4 Zelltherapie**

Mittels Zelltherapie sollen glukoseresponsive, insulinsezernierende Zellen etabliert werden, welche dann alternative Ressourcen zur Transplantation darstellen. Mögliche Kandidaten sind nicht-humane beta-Zellen, Stammzellen, Progenitorzellen, welche durch spezifische Induktion zu beta-Zellen differenzieren oder auch beta-Zellen, die in

in vitro zur Proliferation angeregt werden. Dabei muss die Funktion der beta-Zelle erhalten bleiben, d.h. es müssten Glukosesensitivität und -responsivität, aber auch adäquate Insulinproduktion, -speicherung und -sekretion gewährleistet sein. Gerade die Erhaltung der Glukosesensitivität und Glukoserresponsivität bei entsprechender Insulinausschüttung stellt eines der Hauptprobleme bei der Herstellung von beta-Zellen aus anderen Geweben dar [25]. Um nun ausreichende Mengen generieren zu können, müssten die Zellen in Kulturmedium zur Proliferation angeregt werden. Dabei muss postuliert werden, dass die angestrebten Zelllinien nicht zu malignen Tumorzellen entdifferenzieren. Doch bereits die De-Differenzierung der proliferierenden Zellen mit Verlust der geforderten beta-zellspezifischen Eigenschaften und somit der Glukosesensitivität stellt eine schwierige Hürde dar [26]. Daher wird die Induktion der Inselzellproliferation und die Neogenese von endokrinem Restgewebe oder foetalen Pankreastransplantaten erwogen, zumal die Replikation von bereits existierenden beta-Zellen als auch die beta-Zellneogenese zur Pankreasregeneration führen [27, 28]. Auch adulte Stammzellen werden zunehmend als mögliche Kandidaten für den insulinproduzierenden beta-Zellersatz diskutiert [29]. Welchem Zelltypus als Ausgangsmaterial man sich letztendlich auch zuwenden wird, zentrales Thema aktueller Studien stellt sicherlich die Expansion und entsprechende Differenzierung der jeweiligen Zelle dar.

### **1.2 Molekulare Grundlagen der Regulation von Funktionen in der beta-Zelle des endokrinen Pankreas**

#### **1.2.1 Wachstumseinflüsse auf die beta-Zelle**

Das Wachstum von Inselzellen des Pankreas wird über zwei Mechanismen vermittelt. Zum einen können sie im Sinne einer Neogenese aus duktalem Epithelzellen keimen und so neue Inselzellen bilden oder sie replizieren sich aus den bereits existierenden beta-Zellen [30]. Normalerweise findet man die Neogenese von Inselzellen vornehmlich während der fetalen Entwicklung, konnte jene aber auch im adulten Pankreas während regenerativer Phasen beobachten [31, 32]. Die Replikationsrate der

beta-Zelle ist abhängig von der Anzahl der Zellen, welche aus der G0-Phase des Zellteilungszyklus (G1, S, G2, M) in selbigen eintreten können. Man beachte, dass im gesunden Pankreas eines Erwachsenen die Zellteilungsrate der beta-Zellen innerhalb der hochdifferenzierten Inselzellen zwischen 0,5 und 2% liegt [33]. Dennoch ist es möglich, beta-Zellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen in einen proliferativen Status zu überführen [32, 34]. Als Proliferationsstimuli fungieren beispielsweise Glukose und Aminosäuren [32-35]. Der positive Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Zellproliferation bei beta-Zellen wird durch Prolaktin [36], Somatotropin (GH bzw. „growth hormon“) [37] und Somatomedin C (IGF-1 bzw. „insulin-like-growth-factor-1“) [38, 39] vermittelt. IGF-I erreicht dabei in Kombination mit Glukose synergistische Proliferationseffekte mit respektablen Steigerungsraten. Eine Besonderheit der pankreatischen beta-Zelle ist sicherlich das kontinuierliche Monitoring des aktuellen Nährstoffstatus im Organismus, wonach sich die weiteren Zellfunktionen wie beispielsweise Wachstum oder Insulinsekretion ausrichten [40-42]. Und gerade die durch Wachstumsfaktoren induzierte beta-Zellproliferation ist glukoseabhängig. Darüberhinaus wirkt Glukose selbst mitogen innerhalb der Signaltransduktion [32, 43].

### **1.2.2 Mitogene Signaltransduktionswege**

#### **1.2.2.1 Glukosewirkung in beta-Zellen**

Was die durch Glukose induzierte Mitogenese der beta-Zelle anbelangt, so erstreckt sie sich über einen relativ gut definierten Bereich von 6 mM bis 18 mM Glukose [38, 39]. Durch den Anstieg des Glukosestoffwechsels in der beta-Zelle kommt es zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Level mit nachfolgender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase C (PKC) und des cytosolischen, intrazellulären Calciums [34, 40, 41]. Darüberhinaus kann Glukose unabhängig die Tyrosin-Phosphorylierung von Shc, IRS-1 und IRS-2 anstoßen, was wiederum die Bindung von Grb2/mSOS an Shc/IRS hervorruft und letztlich zur Aktivierung der MAP-Kinase führt [38, 44]. Diese MAPK-Aktivierung konnte jedoch in keinen Zusammenhang mit einer

von der Glukosedosis abhängigen Proliferation gebracht werden. Auch die Hemmung der MEK konnte die glukoseinduzierte DNA-Synthese nicht verhindern [38, 39]. Vielmehr ist die glukosevermittelte Phosphorylierung und somit auch Aktivierung von Erk-1/2 (MAPK) in der beta-Zelle calciumabhängig, was aber wahrscheinlich durch die nachfolgenden Aktivierungen der cAMP-abhängigen Proteinkinasen A (PKA) und/oder auch PKC-Isoformen moduliert wird [45]. Sowohl bei PKA als auch bei PKC konnte gezeigt werden, dass diese Proteine über eine direkte Phosphorylierung der Serin/Threonin-Proteinkinase Raf-1 das Protein Erk-1/2 aktivieren, und zwar unabhängig vom Signalweg über IRS („Insulin-Receptor-Substrate“) [45]. Die Aktivierung des Proteins p70<sup>S6K</sup> durch glukoseinduzierte Phosphorylierung wird ebenfalls unabhängig von IRS-1 und auch PKB gesteuert [46]. Interessanterweise wird p70<sup>S6K</sup> durch mTOR („mammalian target of rapamycin“) phosphoryliert, welches seinerseits als „ATP-Sensor“ im Sinne einer Antwort auf durch erhöhten Glukosemetabolismus ansteigende ATP-Level in der beta-Zelle fungiert [47].

Nicht unwichtig erscheint innerhalb der glukoseabhängigen Signaltransduktion auch die Tatsache, dass Glukose unabhängig von anderen Wachstumsfaktoren die IRS-abhängigen Signalwege aktiviert [38, 39]. Hierzu fördert Glukose, neben der obig beschriebenen Bindung an Grb2/mSOS, die Bindung von IRS-2 an p85, die regulatorische Untereinheit der PI3´Kinase, was wiederum die Aktivität der PI3´K merklich erhöht und somit zu Steigerungen innerhalb der Zellproliferation führt. Dennoch ist diese Aktivierung noch mäßig im Vergleich zur Induktion durch IGF-1 [38, 48]. Die Kinetik der glukoseabhängigen Bindungen von IRS-2-p85 und IRS-2-Grb2-mSOS ist zudem langsamer (>30 min) verglichen mit der durch IGF-1 induzierten Kinetik ( $\leq 2$ min) [48].

### **1.2.2.2 Somatotropin-(GH)-abhängige Signaltransduktion**

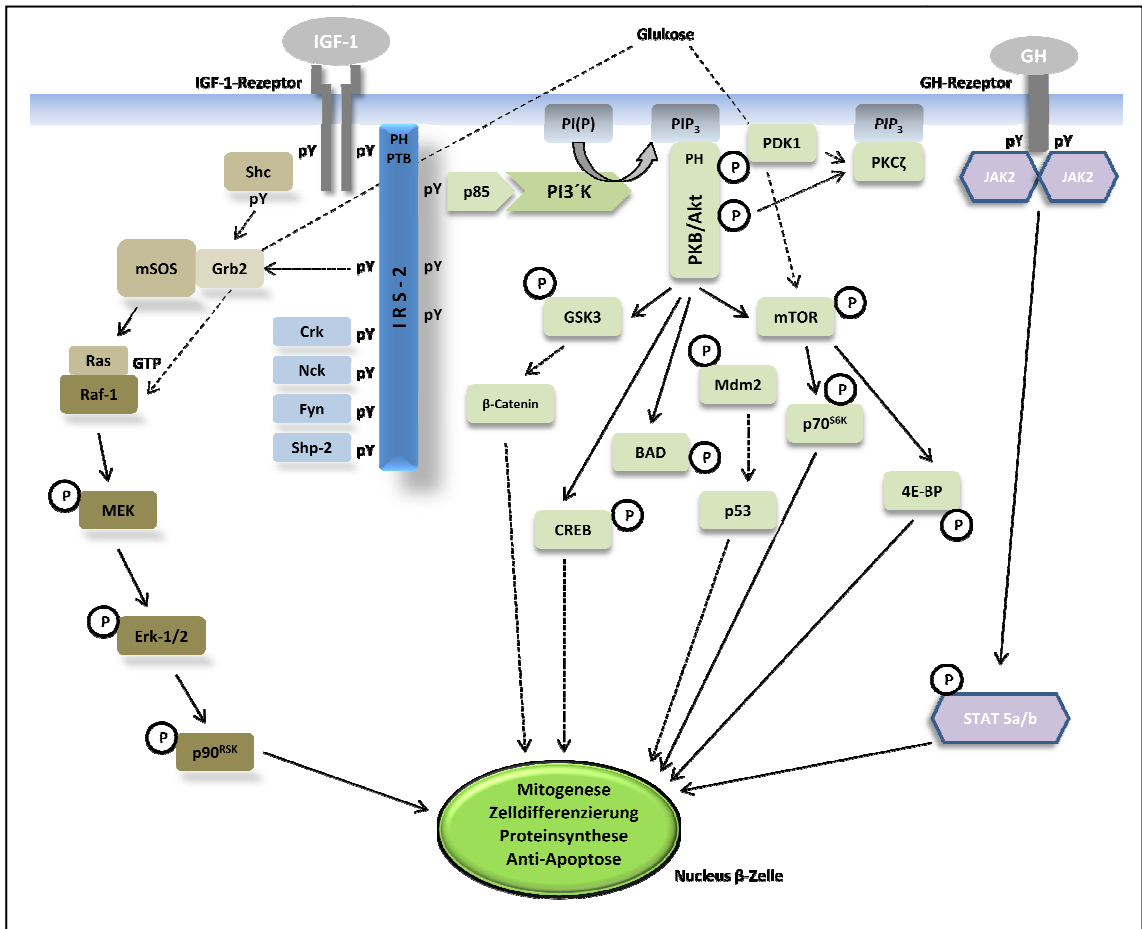
Für die Vermittlung der GH-abhängigen Signaltransduktion zeichnet der Somatotropin-Rezeptor verantwortlich, welcher sich in der Zellmembran der beta-Zelle befindet [2]. Durch die Bindung von GH an seinen Rezeptor kommt es zur Dimerisierung und Bindung von JAK2 (Januskinase 2). Die Tyrosinkinaseaktivität von JAK2 führt zur

Phosphorylierung des sich im Cytosol befindlichen STAT5a/b, welches seinerseits in den Zellkern transloziert. Dort werden Gentranskriptionen aktiviert, die einen Anstieg der beta-Zellmasse fördern. Man weiß inzwischen, dass GH zu einer verstärkten Expression von Cyclin D1 führt, welches innerhalb des Zellzyklus in die Übergangsphase von G1 und S eingebunden ist. Zudem induziert eine STAT5-Aktivierung die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL und Protein aus der SOCS-Familie („suppressors of cytokine signaling“). Letztere hemmen die durch Zytokinrezeptoren vermittelte Signaltransduktion. Dies könnte wichtig für das Überleben der beta-Zelle sein. In einigen Zelltypen erhöht GH sogar die IGF-1-Produktion mit entsprechenden Auswirkungen auf die Mitogenese. In beta-Zellen koexistieren die Signaltransduktionswege von IGF-1- und GH jedoch unabhängig voneinander [1-3, 39, 49].

### **1.2.2.3 IGF-1-abhängige Signaltransduktion**

Die Bindung von IGF-1 an seinen Rezeptor IGF-1R löst eine Autophosphorylierung des Rezeptors durch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität der IGF-1R $\beta$ -Untereinheit aus [50]. Hierdurch können sich Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteine (IRS) sowie auch Shc („Src homology containing protein“) anlagern, was zu deren Phosphorylierung und auch Aktivierung führt. In pankreatischen beta-Zellen ist IRS-2 für die IGF-1-vermittelten Effekte verantwortlich, während IRS-1 vorwiegend in Muskelzellen mitogen wirkt [38]. Die Phosphorylierung wird über selektive Tyrosinreste der Proteine vermittelt, die ihrerseits als Bindungsstellen für verschiedene SH2-Domänen („Shc homology 2“) anderer Effektorproteine zur Verfügung stehen. Zu diesen Effektoren zählen die regulatorische p85-Untereinheit der PI3´Kinase („Phosphatidylinositol-3´-Kinase“), Shp-2/Syp, Grb2, die Tyrosinkinasen Fyn und Csk, die Adaptermoleküle Crk und Nck, sowie PLC $\gamma$  [50, 51]. Es existieren nun zwei Hauptwege, über die die Signaltransduktion in der pankreatischen beta-Zelle läuft: das MAPK-Signalsystem und das PI3´K-Signalsystem [51, 52].





**Abb. 1: Signaltransduktionswege über IGF-1 und GH [1]**

IGF-1 vermittelt über MAPK und PI3'K Mitogenese, Zelldifferenzierung, Proteinsynthese und anti-apoptotische Effekte. GH seinerseits führt nach Bindung an seinen Rezeptor zu dessen Dimerisierung, sodass JAK2 ebenfalls an den Rezeptor binden kann. Die Tyrosinkinase-Aktivität phosphoryliert das cytosolische STAT5a/b, welches anschließend in den Nucleus transloziert. Dort aktiviert es die Transkription der Gene, welche das beta-Zellwachstum fördern [2, 3].

Betrachtet man nun das MAPK-Signalsystem, besteht eine Verbindung zwischen Grb2 und mSOS. Dieser Proteinkomplex wird durch Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 und/oder Shc rekrutiert, sodass die mSOS den Guanin-Nukleotid-Austausch aktiviert, wodurch Ras mit GTP beladen und seinerseits aktiviert wird [50]. In der Folge bildet sich eine spezielle Bindung zwischen Ras und Raf-1 aus. Raf-1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die MEK phosphoryliert. Dadurch wird die Phosphorylierung der MAPK-Isoformen Erk-1/2 durch MEK ermöglicht. Erk-1/2 aktiviert nunmehr p90<sup>RSK</sup> oder transloziert direkt in den Nucleus, um dort die mitogene Transkription verschiedener Gene zu vermitteln [1].

Zum anderen läuft die mitogene Signaltransduktion über PI3´Kinase. Hierbei führt die Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 zu einer Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3´K an deren katalytische Einheit p110 und bildet somit die aktive PI3´Kinase. Diese phosphoryliert PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in der Membran der beta-Zelle, wodurch das Protein PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (oder auch: PIP<sub>3</sub>) entsteht [53]. Die beiden letzteren Proteine stellen sog. „second messenger“ dar. Indem sie an spezifische PH-Domänen („pleckstrin homology“) anderer Proteine binden, werden beispielsweise PKB/Akt oder auch PKC  $\zeta$  aktiviert [46, 53, 54]. Gerade PKB fördert in der nachfolgenden Signaltransduktion die Aktivierung einer großen Zahl an Substratorproteinen, wie z.B. GSK3 $\alpha/\beta$ , mTOR oder p70<sup>S6K</sup>. Dadurch ist eine weitgefächerte Einflussnahme auf Mitogenese, Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und andere Zellfunktionen gegeben [55]. Die vollständige Aktivierung von PKB ist, wie es scheint, abhängig von der Phosphorylierung von Thr-308 in der Aktivierungsschleife der Kinase und von Ser-473 am Carboxyl-Ende der Kinase [56]. Die Phosphorylierung der Thr-308-Stelle wird wiederum durch PDK-1 vermittelt, wobei die Regulierung an der Ser-473-Stelle bisher kontrovers innerhalb des PKB/mTOR-Komplexes diskutiert wird [57-59]. Seit längerem ist bereits bekannt, dass PKB die Phosphorylierung von mTOR („mammalian target of rapamycin“) katalysiert, was wiederum per Phosphorylierung die Aktivierung der p70-S6-Kinase (p70<sup>S6K</sup>) hervorruft [60, 61]. Insgesamt kann dieser spezielle Signalweg über p70<sup>S6K</sup> durch alleinige Glukosestimulation unabhängig von PKB angeschalten werden, wobei für ein vollständiges Ansprechen im Sinne einer Mitogenese der pankreatischen beta-Zelle gleichzeitig eine ausgewogene, durch Glukose vermittelte Stimulation von Erk1/2 stattfinden muss. Weiterhin muss die IGF-1-vermittelte Aktivierung der beiden Signalwege über MAPK bzw. PI3´K ebenfalls fein aufeinander abgestimmt sein, da beispielsweise die chronische Aktivierung des PI3´K/PKB-Verbundes zur Hemmung des MAPK-Komplexes führt [46].

Hervorzuheben ist im Umfeld der PKB-Aktivierung auch die GSK3 („glycogen synthase kinase 3“) mit seinen homologen Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  [62-64]. GSK3 ist ein konstitutiv aktives Enzym und wird durch Insulin, aber auch verschiedenen Wachstumsfaktoren mittels PKB/Akt inaktiviert [65-68]. Darüberhinaus sind an der Inaktivierung weitere

mitogene Moleküle in der pankreatischen beta-Zelle beteiligt, wie z. B. GIP („glucose-dependent insulinotropic polypeptide“), GLP-1 („glucagon like peptide-1“), IGF-1, was eben teilweise auch über den PI3´Kinaseweg vermittelt wird [48, 69-72]. Auf diesen Beobachtungen basiert die Annahme, GSK3 $\beta$  könne ein mögliches Zielprotein diverser zellprotektiver Moleküle innerhalb der beta-Zelle sein [64, 73-75].

### **1.3 Das Protein p8**

Erstmalig wurde das Protein p8 im Rahmen einer experimentell induzierten Pankreatitis beschrieben [76]. Es konnte gezeigt werden, dass p8-mRNA in nahezu allen Geweben als Antwort auf verschiedene Stressoren aktiviert wird [77], und sei es nur durch den routinemäßigen Wechsel des Kulturmediums [78]. Das p8-Gen wurde in Zellen verschiedener Spezies wie Mensch, Ratte, Maus, *Xenopus laevis* und dem Lanzettfischchen *Amphioxus* kloniert [76, 79-82]. Beim Menschen befindet sich die Gensequenz für p8 auf dem Chromosom 16 an Position p11.2 [83]. Es werden zwei Isoformen des Proteins p8 vermutet. Die längere „Isoform a“ sei 100 Aminosäuren lang, während die kürzere „Isoform b“ 82 Aminosäuren aufweist, wobei genauere Studien bezüglich unterschiedlicher Expression oder Funktion der beiden Isoformen bis dato nicht vorliegen [84]. Als ein Charakteristikum, ähnlich einigen Klassen von Transkriptionsfaktoren, kristallisierte sich ein „basic Helix-Loop-Helix“-Motiv in der Sekundärstruktur des Proteins p8 heraus [76]. Auch wenn ein so kleines Protein wie p8 eigentlich kein „nukleäres Lokalisationssignal“ (NLS) benötigen würde, um in den Zellkern transportiert zu werden, lässt sich dieses NLS in der Aminosäuresequenz durchaus bestimmen [76]. Zusätzlich wurde die nukleäre bzw. cytoplasmatische Lokalisation des Proteins p8 nach Überexpression desselben mittels Immunhistochemie nachgewiesen [80]. Desweiteren sind manche biochemischen Eigenschaften des bei Säugetieren auftretenden Proteins p8 denen einiger Proteine der „High Mobility Group“ (HMG) und hierbei v.a. der HMG-I/Y-Gruppe ähnlich [85]. HMG-I/Y-Proteine fungieren als architektonische, chromatinbindende Proteine und spielen eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation zahlreicher Gene [86]. Bei den HMG-Proteinen handelt es sich um Kernproteine, deren Hauptaufgabe in der

Genregulation liegt. Diese erfüllen sie über Erkennung und Modulation von DNA und Chromatinstruktur, und auch über die Regulation der Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die DNA [85]. p8 bindet beispielsweise an die Histon-Acetyltransferase p300 (auch bekannt als CBP) und andere regulatorische Transkriptionsfaktoren (p53, p21, SMAD,...) [87, 88]. Die Bindung von p8 an p300, einem allgemeinen Co-Aktivatoren der Transkription, führt zur Ausbildung eines Komplexes mit konsekutiver Bindung an PTIB („Pax2 transactivation domain interacting protein“). Dadurch wird die Hemmung des Glukagon-Promotors durch PTIB aufgehoben. Dies wurde zwar nur in Glukagon produzierenden Zellen untersucht, könnte aber auch in Insulin produzierenden Zellen als mögliche Transkriptionsregulation validiert werden [84, 87]. Des Weiteren bindet p8 an Jab1 („Jun-activating binding protein 1“), welches unter anderem als multifunktionales Protein bei der Regulierung des Zellzyklus beschrieben wird. p8 ist nunmehr ein zentraler Faktor für die Jab-1-vermittelte Translokation des Cdk-Inhibitors p27 vom Zellkern ins Zytoplasma und somit auch der Ubiquitin-vermittelten Degradation von p27 im 26S-Proteasom [89]. Dies legt den Schluss nahe, dass eine stressbedingte p8-Überexpression den Weg zu verstärkter Zellproliferation durch eine erhöhte p27-Degradation bereitet [84].

Die Übereinstimmung von menschlichem p8 und menschlichem HMG-I/Y beträgt nur 35%, aber in Molekularmasse, isoelektrischem Punkt, Hydrophilizität, der Tatsache einer Denaturierungsresistenz bei Erhitzen über 100°C und der Ladungstrennung sind beide ähnlich [90]. Wie es aussieht, hat p8 schwach DNA-bindende Eigenschaften ohne Affinität zu bestimmten DNA-Sequenzen. Eine zentrale Rolle innerhalb der Transkription ist in Analogie zur HMG-I/Y-Familie anzunehmen [87, 91]. So konnte p8 über signifikant erhöhte p8-Protein-Level eine transkriptionell-regulatorische Funktion für die Hypertrophie von Cardiomyocyten und die Induktion verschiedener Metalloproteasen cardialer Fibroblasten im Rahmen cardialer Erkrankungen attestiert werden [92].

Im Kontext von Tumorerkrankungen wurde p8 anhand des Com-1-Gens beschrieben. Das Com-1-Gen („candidate of metastasis-1“) wurde zunächst im Rahmen von cDNA-Untersuchungen von Rattenzellen eines cerebral metastasierenden Brustkrebses identifiziert, wobei man vermutete, dieses Protein sei eben mitverantwortlich für den Metastasierungsprozess in Krebszellen [93]. Sukzessive fand man heraus, dass dieses Protein identisch mit Protein p8 ist und im menschlichen Organismus das Gegenstück zu Ratten-p8 bildet, aber auch als NUPR1 („nuclear protein 1“) identifiziert wurde [76, 84]. Interessanterweise führt die Translokation t(X;14)(q28;q11.2) auf dem Chromosom Xq28 bei T-Zell-Leukämie zu einer Überexpression des Gens MTCP-1/c6.1B und in der Folge wurde auch verstärkt das Protein p8 im Cytoplasma nachgewiesen [94]. Zunächst bestand die Überzeugung, dieses Molekül löse Metastasierung aus [93], da es zudem mitogene Aktivität besitzt [80]. Jedoch weisen Com-1/p8-defizitäre Fibroblasten von Mausembryonen ein stärkeres Wachstum auf als p8-überstimulierende Fibroblasten [95]. Bemerkenswerterweise sieht man in gering differenzierten Tumorzellen häufig eine cytoplasmatische Fluoreszenzfärbung von Com-1 gegenüber einem Anfärbungsmuster im Nucleus bei mäßig bis gut differenzierten Tumor- aber auch normalen Zellen. Die Färbung von Com-1 war in Schilddrüsenkrebszellen intensiver als in normalem Schilddrüsengewebe [96].

Eine andere Arbeitsgruppe fand heraus, dass es zur Überexpression von Com-1/p8 beim Pankreascarcinom kommt, und dabei auch eine inverse Korrelation zwischen Com-1/p8 und der Apoptose in pankreatischen Tumorzellen besteht [97, 98].

Verfolgt man aber die weitere Studienlage, gewinnt man zunehmend den Eindruck, dass Com-1 eher als inhibitorisches Molekül in Tumorzellen fungiert, als ein Stimulans für die Aggressivität eines Tumors zu sein. Hierzu wurde festgestellt, dass Com-1 mit einer 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-vermittelten Wachstumsinhibition von Brustkrebszellen assoziiert ist, dergestalt 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> einen schnellen und nachhaltigen Anstieg von Com-1 verursachte und gleichzeitig ein Rückgang der Wachstumsrate in der aus Brustkrebszellen gewonnenen Zelllinie MCF7 zu verzeichnen ist [99]. Auch führte die Transfektion von Pankreascarcinomzellen mit Com-1/p8 zur Wachstumshemmung [91]. Wurde p8 ausgeschaltet, wuchsen die Zellen schneller im

Vergleich zu den Zellen, die mit einem retroviralen Leervektor bestückt wurden [91]. Desweiteren soll p8 entscheidend für das Tumorwachstum sein, welches durch das mutierte Protein rasV12 und das Onkogen E1A induziert wird. Hierzu wurden embryonale Mausfibroblasten (MEFs) von Tieren mit den Merkmalen p8 +/+ und p8 -/- mit obiger Onkogenexpression transformiert. Nach Injektion dieser transformierten MEFs entwickelten sich bei mit p8 +/+ behandelten Mäusen Tumorformationen, während bei mit p8 -/- behandelten Tieren keine Tumorformationen auftraten [100, 101].

Es gelang ferner nachzuweisen, dass Com-1/p8 eines der Schlüsselmodulatoren im Rahmen der pro-apoptischen und somit auch anti-tumorösen Effekte von Cannabinoiden darstellt und dass p8 die stressabhängigen Gene ATF-4, CHOP und TRB3 im endoplasmatischen Retikulum hochreguliert und somit seine apoptotischen Effekte ausspielt [102]. Auch wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen Com-1/p8 und Prothymosin einen Schlüsselmechanismus in der durch Staurosporin induzierten apoptotischen Antwort in HeLa-Zellen darstellt [89]. Schließlich wurde im Rahmen weiterer Untersuchungen Com-1/p8 als potentieller Tumorsuppressor bei Prostata-Carcinomen identifiziert [103].

Betrachtet man die Funktionsweise von p8, zeigt sich die vielfältige und zum Teil auch äußerst komplexe Einbindung in die Signalwege von Zellen verschiedenster Organe. Beispielsweise konnte durch Gabe von TGF- $\beta$ 1 eine starke p8-mRNA-Expression in 3T3-Zellen hervorgerufen werden, was seinerseits die Wirkung von Smad auf die Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 verstärkte [104]. Überdies kann durch die Inhibition von MEK 1/2 und JNK die p8-Expression in Tumorzellen des Pankreas gesteigert werden und die Aktivierung des intrazellulären Signalweges Ras-Raf-MEK-ERK und JNK führt zur Verminderung der p8-Expression [91]. Außerdem stellt p8 *in vitro* ein Substrat für Proteinkinase A (PKA) dar und weist in phosphoryliertem Zustand ein komplexeres Maß an Sekundärstruktur und höhere DNA-Bindungsfähigkeiten auf [90]. Ebenso wird p8 für die durch Endothelin vermittelte Zellhypertrophie in diabetisch affizierten Nierenzellen benötigt mittels eines Mechanismus, der ERK, JNK, GSK-3 und auch

PI3'Kinase involviert [105]. Auch wurde in renalen Mesangiumzellen eine Degradation des Proteins p8 im Ubiquitin/Proteasom-System beschrieben [106]. p8 scheint eine wichtige Rolle in der Initiation des LH $\beta$ -Gens, welches für das luteinisierende Hormon (LH) kodiert, während der embryonalen Zelldifferenzierung zu spielen [107].

Bei akuter Pankreatitis förderte p8 die Expression von PAP-1 („pancreatitis associated protein-1“) [108]. PAP-1 wurde ebenfalls im Rahmen einer experimentell induzierten Pankreatitis identifiziert, wird aber auch bei systemischen Infektionen exprimiert [109-111]. In Azinuszellen des Pankreas wird PAP-1 durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) über den MEK1-Signalweg („mitogen-activated protein kinase-1“) induziert. Unter Einfluss von TNF- $\alpha$  weisen Zellen, bei denen PAP-1 überexprimiert wurde, signifikant weniger Apoptose auf [112]. Auch bei oxidativem Stress sorgt eine PAP-1-Überexpression für einen anti-apoptotischen Effekt [113]. Durch die p8-vermittelte Expression von PAP-1 empfiehlt sich p8 einmal mehr als Stressprotein [114].

Darüberhinaus zeigte sich, dass das in *Drosophila melanogaster* vorkommende p8 unmittelbar in die Stressantwort im Rahmen eines Hungerstoffwechsels involviert ist [115]. In Inselzellen und beta-Zellen des Pankreas sind nukleäres p8 und glukoseabhängiges Zellwachstum eng miteinander verbunden [116].

Zusammenfassend ist die Expression von p8 keineswegs organspezifisch. So ließ sich unter anderem in Herz, Nieren, Leber, Speicheldrüsen, Magen-/Darmtrakt, Lunge und Pankreas eine signifikante unspezifische Zellproliferation nachweisen. p8 ist an vielerlei Prozessen der Zelle beteiligt, sei es nun im Rahmen zellulärer Entwicklung und Differenzierung, bei der Regeneration, als Stressantwort, bei der Apoptose oder als Transduktor wachstumsinduzierender Botenstoffe wie Glukose [116]. Also Prozesse, bei denen die Zellproliferation im Vordergrund steht. Interessanterweise ist die Expression von p8 in gesundem und gut differenziertem Gewebe stark vermindert. Einige Autoren sehen hierin einen Anhaltspunkt für p8 als eigenständigen Wachstumsfaktor [76]. Betrachtet man andererseits die strukturellen Gegebenheiten bei p8 mit nukleärem Lokalisationssignal (NLS), „Helix-Loop-Helix“-Motiv und der Strukturhomologie zu Homeodomain-Transkriptionsfaktoren, muss man p8 durchaus

auch die Rolle als Transkriptionsfaktor zugestehen, zumal die DNA-Bindungsfähigkeit und die transkriptionell-regulatorischen Fähigkeiten von p8 mehrfach hervorgehoben wurden [84, 88, 117, 118].

Im Speziellen wurde beschrieben, dass während der Akutphase einer Pankreatitis viele Gene angeschaltet werden, die entweder den Fortgang der Erkrankung verhindern oder aber für die Regeneration des Pankreas verantwortlich zeichnen. Hierunter fallen Gene wie PAP I, II, II, c-myc und H-ras als Onkogene, sowie das für das Zytoskelett wichtige Villin und Actin [119-123]. Interessanterweise werden aber auch die mRNA der Wachstumsfaktoren IGF-1, IGF-2, IGF-1-Rezeptor und IGF-bindendes Protein 1 und 3, HGF (hepatocyte growth factor), dessen Rezeptor (c-met) und schließlich auch anti-apoptotische Gene aktiviert [124].

Inwiefern p8 nun in all diese Vorgänge integriert ist, ist nur teilweise verstanden, und die wesentliche Funktion von p8 ist noch nicht hinreichend bekannt.

### **1.4 Themenstellung**

Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die Rolle von p8 im Rahmen der proliferationsassoziierten Signaltransduktion in Insulin produzierenden beta-Zellen des endokrinen Pankreas zu charakterisieren.

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf das Verständnis von p8 im Rahmen des Zellwachstums, d.h. welche Faktoren vermitteln vermehrte Proliferation bzw. wodurch kann diese unter Umständen vermindert werden. Weiterhin sollen mögliche Bindungspartner innerhalb der Signaltransduktion und mögliche Regelkreise des mitogenen Signalweges, an denen p8 beteiligt ist, herausgearbeitet werden.

Durch diese Charakterisierung von p8 hinsichtlich seiner Funktion in der proliferationsassoziierten Signaltransduktion der insulinproduzierenden beta-Zelle des endokrinen Pankreas will die Arbeit zur Entwicklung weiterer Therapiestrategien bei Diabetes mellitus beitragen. Ein möglicher Ansatz stellt hierbei die Beschleunigung der Zellproliferation von zu insulinproduzierenden Zellen differenzierten Stammzellen mittels p8 dar, um schnell geeignetes Spendergut zu erhalten. Auch eine Beteiligung von p8 an der Differenzierung von Stammzellen ist denkbar.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

15-ml-Röhrchen	Falcon
50-ml-Röhrchen	Falcon
6-well-Platten	Greiner-Labortechnik
96-well-Platten	Greiner-Labortechnik
Autoklav	Melag
Automatische Pipette	Eppendorf
Blot-Apparatur (Multiphor II)	Pharmacia Biotech
Brutschrank	Heraeus
Cryo-Röhrchen	Greiner-Labortechnik
Einmalhandschuhe	Safeskin
Eismaschine	Scotsman
Elektroporator	Biorad
Entwickler (Optimax)	Protec
Feinwaage	Chyo
Fotomaterial	Kodak
Gelelektrophoresekammer „Mini Protean 3“ + „Power Pac“	Biorad
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch, Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Genheimer
Glasfaserfilter	Packard
Glaswaren	Schott
Heizblock	Liebisch
Klarsichtfolie	Melitta
Kühlschrank	Bosch
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	Hartenstein

## Material und Methoden

---

Mikrowelle	Siemens
Nitrocellulosemembran	Millipore
Objektträger	Marienfeld
PCR-Gefäße	Hartenstein
PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 9700)	Perkin Elmer
pH-Meter	Hartenstein
Photokassette	Siemens
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Brand
Pipettenspitzen	Brand
Plastikschalen	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße	Greiner
Schüttelinkubator	Bühler
Sterile Arbeitsbank	Heraeus
Sterile Einmalfilter	Schleicher + Schuell
Spektralphotometer	Dynatec
Szintillationszähler	Wallac
Thermomixer	Eppendorf
Tris-Tricine-Gele	Biorad
UV-Küvetten	Eppendorf
UV-Lampe	Hartenstein
Vibrofix	Janke und Kunkel
Waage	Kern
Wasserbad-Inkubator	Kötterman
Western-Blot-Apparaturen (Semi-Dry und Wet-Transfer)	Biorad/ Peqlab
Zellernter	Inotech
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson
Zellkulturschalen	Becton Dickinson
Zellschaber	Hartenstein

Zentrifugen

Beckman, Eppendorf,  
Hettich

### **2.1.2 Software**

Microsoft™ Office 2007

GraphPad Software, Inc: GraphPad Prism™ 3.0

### **2.1.3 Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen, sofern dies nicht anders angegeben wird.

AMERSHAM BIOSCIENCES

APPICHEM

BIORAD

BRAUN

CALBIOCHEM

GIBCO

INOTECH

MERCK

NESTLE

ROTH

SIGMA

### **2.1.4 Radioaktive Isotope**

NEN, Boston, MA, USA: Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin

Szintillationsflüssigkeit (Wallac)

### **2.1.5 Enzyme und Laborkits**

DNase 1 (Boehringer)

Ex-Taq-Polymerase (Takara)

Restriktionsenzyme (PROMEGA)

RNAse-Inhibitor (PROMEGA)

BCA<sup>®</sup> Protein Assay Reagent Kit (Pierce)

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, RPN 2132 (Amersham Biosciences)

peqGOLD RNAPure<sup>®</sup> (peqLab Biotechnologie GmbH)

Plasmid DNA Purification-Kit „NucleoBond“ (Macherey-Nagel)

Lambda Protein Phosphatase (recombinant protein expressed in E. coli), (Upstate)

Phosphothreonine Detection Kit (Calbiochem)

Phosphoserine Detection Kit (Calbiochem)

### **2.1.6 Puffer und Lösungen**

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen für die jeweiligen Enzymreaktionen verwendet. Etwaige selbständig angefertigten Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt.

### **2.1.7 Zellen**

Um Studien zu Expansionsfaktoren für beta-Zellen respektive ihrer Vorläuferzellen überhaupt betreiben zu können, müssen möglichst wirklichkeitsgetreue Modelle für die beta-Zelle des endokrinen Pankreas gefunden werden. Früher fungierten diverse Zelllinien als Vertreter einer Pankreas-Inselzelle. Dies umfasste Linien wie die nur schwach differenzierte RINm5F-Zelllinie mit geringem Insulingehalt und fehlender Insulinsekretion [125], aber auch Mäuse-Zelllinien wie MIN-6, βTC6-F7 und βHC9 [126-129], welche einen Insulingehalt ähnlich einer normalen Inselzelle aufweisen und auch zu geringen Anteilen eine glukoseabhängige Insulinsekretion besitzen. Teilweise wachsen derlei Zellen sehr langsam, sind somit für Studien ungeeignet oder

sezernieren Insulin nach Gabe von Stoffen, welche normale Pankreas-Inselzellen nicht stimulieren oder bestimmte Enzymaktivitäten entsprechen nicht der Wirklichkeit [130-133]. Aktuell dienen INS-1-Zellen als Modell für die beta-Zelle des endokrinen Pankreas.

Bei INS-1-Zellen handelt es sich um Zellen eines strahleninduzierten Insulinoms einer Ratte [127]. Diese Zellen wurden durch die Arbeitsgruppe um Wollheim mit einem Plasmid stabil transfiziert, welches das humane Insulin-Gen sowie einen Cytomegalie-(CMV)-Promotor und ein Resistenzgen für Neomycin enthielt. Die Zellen wurden in einem mit G418 angereicherten Selektionsmedium kultiviert. Die Vorteile dieser INS-1-Zellen, im folgenden Wildtyp-INS-1-Zellen oder WT-INS-1-Zellen genannt, sind die fehlende Entdifferenzierung, die glukoseabhängige Insulinsekretion und eine physiologische Antwort auf sekretorisch wirkende Stoffe [127].

INS-1            Betazelllinie des endokrinen Pankreas der Ratte (Wollheim, Genf)

p8-INS-1        Stabil transfizierte INS-1-Zelllinie (Prof. Seufert, eigene Arbeitsgruppe)

### 2.1.8 Medien

#### **Medium für INS-1-Zellen:**

RPMI 1640	85,7 %
Fötale Rinderserum (FBS), hitzeinaktiviert	10 %
Glutamin	1 %
HEPES-Puffer	1,1 %
Natriumpyruvat	1,1 %
β-Mercaptoethanol	0,1 %
Penicillin / Streptomycin	1 %

#### **Medium für p8-INS-1-Zellen:**

INS-1-Zellkulturmedium	
G418-Sulfat	0,1 mg/ml (gelöst in HEPES-Puffer, 1:10 verdünnt in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> )
Hygromycin	0,01 %

### **Einfriermedium für INS-1-Zellen:**

INS-1-Zellkulturmedium	83 %
Fötale Kälberserum (FBS)	10 %
DMSO	7 %

### **SOC-Medium:**

Hefeextrakt	0,5 %
Casein	2 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM (steril filtriert)
Glucose	20 mM (steril filtriert)

### **LB-Medium:**

Hefeextrakt	0,5 %
Caseinhydrolysat/Pepton	1 %
NaCl	0,5 %
IPTG	0,5 – 1 mM
bei Bedarf: Agar	1,5 %
	Selektionsantibiotikum
	X-Gal 80 µg/ml

### **2.1.9 Plasmide**

Das Plasmid p8OPRSVI wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe von Martin Gehlen et al. erstellt und enthält einen Rous-Sarkom-Virus-Promotor (RSV), einen lac-Operon-Repressor und p8-cDNA. Zudem sind Neomycin- und Ampicillin-Resistenz verankert. (Stratagene, LacSwitch II Inducible Mammalian Expression System®). Zur detaillierten Beschreibung der Herstellung des Plasmids siehe „2.2.6 Das p8-exprimierende Plasmid“.

### **2.1.10 Wachstums- / Stimulationsfaktoren**

Fötale Kälberserum

Glucagon-like-peptide-1 (Calbiochem)

Insulin-Like Growth Factor-I, Human, Recombinant, E. coli (Calbiochem)

Interleukin-1 $\beta$  (Calbiochem)

Prolactin, Human Pituitary, Iodination Grade (Calbiochem)

Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, Human, Recombinant, CHO Cell Line (Calbiochem)

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (Calbiochem)

### **2.1.11 Proteinaktivitätsinhibitoren**

Lactacystin, Synthetic (Calbiochem)

PKA Inhibitor Peptide (Upstate Biotechnology)

PKC- $\alpha$ / $\beta$ -Inhibitor (Biomol GmbH)

PKC- $\zeta$ -Inhibitor (Biomol GmbH)

SAPK2/p38-Inhibitor, SB 202190 (Upstate Biotechnology)

Wortmannin (Calbiochem)

### **2.1.12 Größenmarker**

#### **DNA-Größenmarker:**

GeneRuler<sup>®</sup> 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

#### **Protein-Größenmarker:**

Low Range Rainbow<sup>®</sup> Molecular Weight Markers, RPN 755 (Amersham Biosciences)

High Range Rainbow<sup>®</sup> Molecular Weight Markers, RPN 756 (Amersham Biosciences)

### **2.1.13 Positivkontrollen**

Non-Stimulated A431 Cell Lysate (Upstate)

EGF-Stimulated A431 Cell Lysate (Upstate)

Jurkat Cell Lysate (Upstate)

3T3 Cell Lysate (Upstate)

Rekombinantes p8 (eigene Arbeitsgruppe)

## **2.1.14 Antiserum**

### **2.1.14.1 Primärantiseren**

(Upstate, wenn nicht anders angegeben)

Anti-phospho-Akt1/PKB $\alpha$  (Ser 473)

Anti-GLUT2 (Santa Cruz)

Anti-GST (Santa Cruz)

Anti-phospho-IRS-1 (Ser 307)

Anti-IRS-2

Anti-IGF-I-Receptor  $\alpha$  subunit

Anti-JAK2

Anti-phospho-JAK2 (Y1007, Y1008)

Anti-MAP Kinase 1/2 (Erk1/2-CT)

Anti-phospho-MEK1 (Thr 292)

Anti-mTOR (mTAb1)

Anti-Phosphotyrosine

Anti-PI3-Kinase, p85 Subunit

Anti-PI3-Kinase p85, Agarose conjugate

Anti-p8 (eigene Arbeitsgruppe)

Anti-PKA, NT

Anti-phospho-PKA, RII (Ser 96)

Anti-Protein Kinase C Set (Biomol)

Anti-Protein kinase C  $\alpha$

Anti-Protein kinase C  $\beta$ I

Anti-Protein kinase C  $\beta$ II

Anti-Protein kinase C  $\gamma$

Anti-Protein kinase C  $\delta$

Anti-Protein kinase C  $\epsilon$

Anti-Protein kinase C  $\zeta$

Anti-Protein kinase C  $\eta$

Anti-PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )



Anti-PKC zeta

Anti-Human Shc

Anti-SHC

Anti-phospho-SHC (Y317)

Anti-phospho-Smad2 (Ser465/467)

Anti-phospho-Src (Tyr416), clone 9A6

Anti-phospho-STAT5A/B (S726/731)

### **2.1.14.2 Sekundäntiseren**

Anti-Rabbit IgG (H+L), Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)

Anti-Rabbit IgG (H+L), Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)

Anti-Mouse IgG, Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von beta-Zellen des endokrinen Pankreas**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von INS-1-Zellen**

Als Zelllinien wurden INS-1-Zellen und p8-überexprimierende INS-1-Zellen (p8-INS-1) verwendet und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in entsprechenden Zellkulturflaschen und Medium kultiviert [127]. Nach ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen mit PBS mehrmals gewaschen und mittels 10%-igem Trypsin für 5 min bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch die Aufnahme der Zellen in FBS-haltigem Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Zellniederschlag

(„Zellpellet“) in frischem Medium aufgenommen und durch kräftiges Schütteln wieder gelöst. Danach wurden die Zellen entweder für Stimulationsversuche auf Zellkulturplatten oder in Zellkulturflaschen für die Kultivierung ausgesät.

### **2.2.1.2 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wuchsen diese bis zu einer Konfluenz von 80-90%. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurde der Zellniederschlag („Zellpellet“) in spezielles Einfriermedium aufgenommen. Dieses besteht zu 83% aus INS-1-Medium, zu 10% aus FBS und zu 7% aus DMSO. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1 ml Aliquote in Kryoröhrchen abgefüllt und zunächst für 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt, bevor sie über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden. Am darauffolgenden Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

### **2.2.1.3 Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur angetaut und dann im halbgefrorenen Zustand in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm, Absaugen des Überstandes und Aufnahme der Zellen in entsprechendes Medium wurde das Zellgift DMSO aus der Suspension entfernt. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung ausgesät.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer**

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Suspension von INS-1-Zellen wurde die sogenannte „Neubauer-Zählkammer“ verwendet. Diese ist ein Objektträger, in den ein Gitternetzwerk eingraviert ist. Zusammen mit einem Deckgläschen wird innerhalb dieses Gitters ein definiertes Flüssigkeitsvolumen festgehalten, wenn man mit der Pipette 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension unter das Deckgläschen strömen lässt. Die Neubauerkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes Quadrat hat eine Seitenlänge von 0,2 mm, d.h eine Fläche von  $0,04\text{ mm}^2$ . Dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von  $0,004\text{ }\mu\text{l}$ . Es sollten nur die vier großen Eckquadrate, die

jeweils wiederum aus 16 kleinen Quadraten bestehen, ausgezählt und der Mittelwert errechnet werden. Die ermittelte Zellzahl wird mit  $10^4$  multipliziert sowie mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension. Dies ergibt die Zellzahl pro  $\mu\text{l}$ .

### **2.2.3 Stimulation der Zellen**

Wenn die Zellen auf den einzelnen Zellkulturplatten eine Konfluenz von 70-80% erreichten, wurden sie für 24 h in Hungermedium (siehe 2.1.8) gehalten. Dieses Medium enthält keine Wachstumsfaktoren, sondern nur die Grundbestandteile des INS-1-Mediums, 0,5 mM Glukose und 0,1% BSA (bovines Serumalbumin). Man geht davon aus, dass dadurch alle Zellen ihren Stoffwechsel auf ein Minimum beschränken und somit alle Zellen eine gleiche Ausgangsposition einnehmen (=Synchronisierung). Anschließend wurde dem Medium je nach Stimulationsbedingung das jeweilige Agens zugegeben, d.h. Glukose und/oder Wachstumsfaktoren. Die Zellkulturplatten wurden für verschiedene Zeiträume im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

### **2.2.4 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion via Elektroporation stellt eine Möglichkeit dar, Überexpressionen von bestimmten Proteinen in Zellen zu erreichen. Dabei werden die Zellen einem elektrischen Impuls ausgesetzt, wodurch die Zellmembran permeabel wird und ein Plasmid, das die cDNA eines definierten Proteins exprimiert, ins Zytoplasma aufgenommen wird. Dort kann nun bei erfolgreicher und effizienter Transfektion dieses Protein vermehrt gebildet werden.

### **2.2.5 Extraktion von Gesamtzelllysaten**

Nach Stimulationsende wurden die Zellkulturplatten auf Eis gestellt, um die Stoffwechselforgänge in den Zellen zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, wobei am Schluss ein Überstand von ca. 10 ml belassen wurde. Die adhärenen Zellen wurden mittels eines Zellschabers vom Boden

abgelöst und die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Nach der Zentrifugation für 4 min bei 1200 rpm und 4°C wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 500 µl Lysepuffer (bestehend aus: 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, NP-40, Protease-Inhibitor) resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate verblieben anschließend für 20 min auf Eis, um die Zell- und Kernmembranen zu lysieren und die Proteine in Lösung zu bringen. Anschließend wurden die Lysate für 3 min bei 6300 rpm zentrifugiert, um Membran-, Zytoskelett- und sonstige Zellanteile vom Proteinüberstand zu trennen. Danach konnten die Lysate bei -20°C für einige Monate gelagert werden [134, 135].

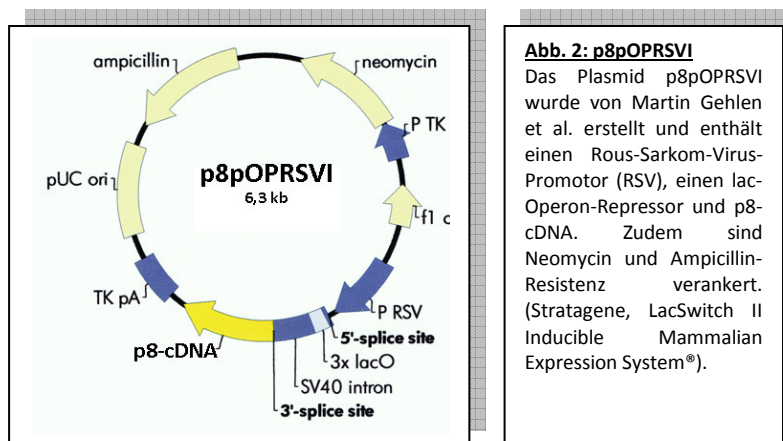
### **2.2.6 Das p8-exprimierende Plasmid**

Um nun die Rolle von p8 näher untersuchen zu können, wurden Wildtyp-INS-1-Zellen (WT-INS-1, siehe auch 3.1.1) mit einem induzierbaren, p8-exprimierenden System ausgestattet. Dabei handelt es sich in der Grundkonstruktion um das sog. „LacSwitch inducible mammalian expression system“<sup>®</sup> der Fa. Stratagene. Dieses greift auf das Lactose-Operon (lac-Operon) von *Escherichia coli* zurück. Der Lac-Repressor bindet als Homotetramer an das lac-Operon und verhindert so die Transkription des nachfolgenden Genabschnittes. Die Bindung von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) an den Lac-Repressor führt zu einer Konformationsänderung des Lac-Repressors mit verminderter Affinität zum lac-Operon. Der Repressor löst sich vom Operon, wodurch es zur Transkription des nachfolgenden kodierenden Abschnittes kommt.

In unserer Arbeitsgruppe (Martin Gehlen et al.) wurde die erste stabile Transfektion der INS-1-Zellen mit dem Plasmid P3`SS (Stratagene, Kirkland, USA) durchgeführt, welches für den Lac-Repressor kodiert. Im nächsten Schritt wurde Ratten-p8-cDNA in das den Lac-Promotor und das Lac-Operon enthaltende Plasmid pOPRSV1-CAT (Stratagene, Kirkland, USA) anstelle der CAT-Untereinheit kloniert. Dabei besaß das Plasmid zwei die CAT-Untereinheit flankierende Not1-Sides (bei 3061 und 3838 Basenpaaren). Dazwischen wurde p8-cDNA unter Verlust der CAT-Untereinheit ligiert, indem das Plasmid pOPRSV1-CAT mit Not1 verdaut, die Überhänge mittels Klenow-Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt und mit Alkalischer Phosphatase

dephosphoryliert wurden und das Plasmid mit p8-cDNA letztlich durch T4-Ligase ligiert wurde. Das so neu entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung p8pOPRSV1 (siehe Abb. 2).

Nach erfolgreicher zweiter Transfektion obiger WT-INS-1-Zellen wurden diese kultiviert. Diese Zelllinie ist Grundlage der vorliegenden Arbeit und wird im Weiteren als p8-INS-1 bezeichnet.



## 2.2.7 Proteinanalytische Methoden

### 2.2.7.1 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration innerhalb eines Zelllysates erfolgte mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kit“<sup>®</sup> von Pierce. Dieses beinhaltet einen Standard mit acht definierten Konzentrationen aus bovinem Serumalbumin, anhand derer sich eine Eichgerade erstellen lässt. Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten Lysate auf Eis aufgetaut und für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Es wurden 10 µl aus den Lysaten entnommen und mit Aquabidest auf 50 µl Volumen aufgefüllt. Anschließend wurde das „Working Reagent“ aus den Flüssigkeiten „A“ und „B“ des Kits im Verhältnis 50:1 hergestellt und jeder Lysatprobe und den Standardproben 1 ml davon zugegeben. Die Proben inkubierten für 30 min bei 37°C und wurden dann im Photometer bei 562 nm vermessen. Durch die OD-Werte der Standardproben ließ sich eine Eichgerade

erstellen, mit deren Hilfe die OD-Werte der Lysatproben auf die Proteinkonzentration im Lysat umgerechnet werden konnte.

Es gilt:  $y = mx + t$  Formel der Eichgeraden aus den OD-Werten der Standardproben, wobei  
 $x$  = Proteinkonzentration der BSA-Lösung und  
 $y$  = OD-Wert der jeweiligen BSA-Lösung

$$\text{Proteinkonzentration des Lysats in } \mu\text{g}/\mu\text{l: } \frac{(\text{OD-Wert der Probe} - t) * 0,005}{m}$$

### 2.2.7.2 Immunoblotanalyse von Proteinen

Durch die Western Blot-Technik [134, 135] lässt sich sowohl das Vorhandensein als auch das Molekulargewicht eines Proteins nachweisen. Diese semiquantitative Methode unterteilt sich in fünf Schritte:

- 1) Elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben (SDS-PAGE),
- 2) Transfer der nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran,
- 3) Blocken der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran,
- 4) Inkubation der Membran mit Primär- und Sekundärantikörper,
- 5) Detektion.

### 2.2.7.3 Elektrophoretische Proteinauftrennung in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 7,3 x 8 x 0,15 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie bestanden aus einem unteren Trenngel (7,5 - 15%-ig) und einem oberen Sammelgel (5%-ig). Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von etwa 1 cm

unterhalb des Taschenformers zwischen zwei Glasplatten der Gelapparatur gegossen und zur Ausbildung einer glatten Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das zu untersuchende Proteingemisch wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor es auf das Gel aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer für etwa 2 h bei 100 V.

### 2.2.7.4 Transfer von Proteinen

Nach SDS-Gelelektrophorese der Proteinproben fand ein Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran nach der Wet-Transfer-Methode mit Hilfe einer Wet-Transfer-Apparatur der Firma Biorad (siehe 2.1.1) statt. Dabei wurden vier Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Diese wurden nach folgendem Schema im Gelkassettenhalter geschichtet (von Kathode zur Anode):

- 1 Fiberglasmatte in Transferpuffer getränkt
- Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt
- SDS-Polyacrylamidgel in Transferpuffer getränkt
- Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt
- 2 Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt
- 1 Fiberglasmatte in Transferpuffer getränkt

Der Gelkassettenhalter wurde entsprechend der Polarisierung in die Halterung des Transfertanks eingeschoben. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Kühlung der gesamten Apparatur für 30-60 min und einer eingestellten Spannung von 100 V. Waren auf der Nitrocellulosemembran die Banden des jeweils auch auf das Polyacrylamidgel aufgetragenen vorgefärbten Proteinmarkers vorhanden, so wurde davon ausgegangen, dass die restlichen Proteinproben ebenfalls transferiert worden sind.

Eine weitere Transfermethode, die Anwendung fand, war das Semi-Dry-Transfer-Verfahren. Dabei wurde eine Graphit-Blot-Apparatur der Firma Peqlab verwendet.

Hierbei wurden neun Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran ebenfalls auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Diesmal erfolgte der Aufbau der Blot-Apparatur nach folgendem Schema (von Anode zur Kathode):

- Whatman-Filterpapiere in Semi-Dry-Transferpuffer 2 getränkt
- Whatman-Filterpapiere in Semi-Dry-Transferpuffer 1 getränkt
- Nitrocellulosemembran in Semi-Dry-Transferpuffer 1 getränkt
- SDS-Polyacrylamidgel in Semi-Dry-Transferpuffer 3 getränkt
- Whatman-Filterpapiere in Semi-Dry-Transferpuffer 3 getränkt

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Raumtemperatur für 90 min und einer konstant gehaltenen Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Blotfläche.

### **2.2.7.5 Blocken der Membran**

Um unspezifische potentielle Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Nitrocellulosemembran entweder für etwa 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit einer Lösung aus PBS und 5% Magermilchpulver oder PBS und 5% BSA inkubiert.

### **2.2.7.6 Immunochemischer Nachweis von Proteinen**

Der Western Blot ermöglicht den Nachweis von Proteinen unter Verwendung eines spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichteten gereinigten monoklonalen Antikörpers oder eines polyklonalen Antiserums, die an einer oder mehreren Stellen des Proteins binden können. Die Detektion des bindenden Antikörpers erfolgt durch Zugabe eines zweiten, mit Meerrettichperoxidase markierten Antikörpers, der spezifisch an den  $F_c$ -Teil des ersten Antikörpers bindet. Durch die Peroxidase kommt es



nach Substratzugabe zu einer Chemilumineszenzreaktion, die durch Belichtung eines Films sichtbar gemacht wird.

Nach der Absättigung wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit dem Antiserum inkubiert. Dieses wurde in PBS mit Tween 20 verdünnt. Um nicht gebundene Antikörper vollständig zu entfernen, wurde die Membran viermal 15 min mit PBS und Tween 20 gewaschen, anschließend 30-60 min bei Raumtemperatur mit dem zweiten, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert und erneut viermal 15 min mit PBS und Tween 20 gewaschen.

### **2.2.7.7 Detektion der Antikörperbindung**

Nach der Inkubation der Antikörper wurde die Membran 1 min lang in einem Chemilumineszenzreagenz der Firma Amersham geschwenkt. Durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase wird das Substrat unter Freisetzung von Licht umgesetzt. Diese Lichtreaktion ermöglicht die Belichtung eines Filmes und letztlich eine Darstellung der spezifischen Proteinbanden auf der Membran.

### **2.2.7.8 Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

Zur Färbung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel nach der Entfernung aus der Elektrophoreseapparatur für 15 min in einer 0,25%-igen Coomassie-Blau-G-250-Lösung geschwenkt. Die Auswaschung von nicht an Proteine gebundenem Farbstoff erfolgte entweder langsam in einer Lösung aus 10% Essigsäure und 20% Methanol, oder schnell durch mehrmaliges Aufkochen des gefärbten Geles in Aquabidest in einem Mikrowellengerät. Danach wurde das Gel in Einmachfolie verpackt und bei 80°C für 45 min im Vakuum getrocknet.

### **2.2.7.9 „Strippen“ von Nitrocellulosemembranen**

Um weitere Proteine auf einer Nitrocellulosemembran detektieren zu können, mussten die daran gebundenen Antikörper zuerst entfernt werden. Hierzu wurde die Membran 30 min bei 50°C in Stripping-Puffer geschwenkt und anschließend zweimal

10 min mit PBS gewaschen. Die so behandelte Membran konnte erneut mit einer Lösung aus PBS und 5% Magermilchpulver geblockt werden.

### **2.2.7.10 Co-Immunopräzipitation von Proteinen**

Direkte Protein-Protein-Bindungen wurden mittels der Co-Immunopräzipitations-Analyse nachgewiesen [134, 135].

Dabei werden 500 bis 1000 µg Protein eines Lysates mit Aquabidest oder Lysepuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von bis zu 10 µg Antikörper inkubiert die Probe für 2 h oder über Nacht bei 4°C im Orbitalrotationsmischer. Anschließend werden 100 µl Protein-A-Sepharose zugegeben und die Probe für weitere 2 h bei 4°C rotiert. Die Sepharose bindet dabei den Antikörper, der seinerseits an das zu untersuchende Protein bindet.

Nun wird die Probe kurz zentrifugiert (14000 rpm für 5 Sek.), der Überstand abgesaugt und mit ca. 500 µl kaltem Lysepuffer oder PBS zum Waschen resuspendiert. Dieser Vorgang wird zwei- bis dreimal wiederholt.

Abschließend wird der Überstand nahezu vollständig abgesaugt, die Probe mit 24 µl DTT und 48 µl Laemmli-Puffer (5ml Glycerol, 5 ml SDS 20% mit 1,5 M Tris-HCl, 1 Prise Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Hälfte der Probe kann jetzt auf je ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden. Nach der Elektrophorese und dem Transfer wird die eine Membran mit einem sog. irrelevanten Antikörper behandelt und die andere mit dem Antikörper, für dessen Zielprotein eine direkte Bindung mit dem zu untersuchenden Protein vermutet wird. Durch die unterschiedliche Antikörperbehandlung der Membranen können unspezifische Kreuzreaktionen besser identifiziert werden.

### **2.2.7.11 GST-Pull-Down**

Eine weitere Nachweismethode für direkte Protein-Protein-Bindungen stellt der GST-Pull-Down dar. Man verwendet dabei ein sog. Fusionsprotein, d.h. an das zu

untersuchende Protein (in vorliegendem Fall Protein p8) wurde das Protein GST (Glutathion-S-Transferase) gekoppelt.

Zunächst inkubiert man 50-100 µg eines Gesamtzelllysates für 30 bis 60 min im 37°C-Wasserbad mit dem Fusionsprotein. Dadurch bilden sich mögliche Bindungen zwischen dem zu untersuchenden Protein und anderen Proteinen aus dem Lysat aus. Durch die GST-Kopplung kann man nun diese gebundenen Proteine mittels GST-Sepharose extrahieren. Dafür werden ca. 100 µl GST-Sepharose zu den Proben zugegeben und diese über Nacht bei 4°C rotiert. Nach Aufreinigung und Western Blot analog zur Co-Immunopräzipitation lassen sich nun mittels geeigneter Antikörper direkte Protein-Protein-Bindungen identifizieren.

### **2.2.7.12 Immunhistochemischer Nachweis**

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine aufgrund von Antikörperbindungen im konfokalen Lichtmikroskop unmittelbar sichtbar gemacht werden.

Zunächst werden die Zellen in Platten mit quadratischen Kammern auf Deckgläschen kultiviert und entsprechend der Fragestellung stimuliert. Danach wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 3,7 %-igem Paraformaldehyd (PFA) auf den Deckgläschen fixiert. Weiterhin werden zwei verschließbare Schalen mittels in PBS angefeuchtetem Whatmann-Filterpapier und Parafilm zu feuchten Kammern umgebaut. Auf dem Parafilm wird entsprechend den Plattenkammern für die Zellkultivierung ein Gitternetz aufgetragen, um die Deckgläschen später in ihr jeweiliges Feld übertragen zu können.

Nach der Fixierung werden die Deckgläschen sechsmal in mit PBS gefüllten Bechergläsern gewaschen und anschließend mit der Zellseite auf einen Tropfen aus PBS und 10 %-igem FBS für mindestens 1 h in die feuchte Kammer gelegt. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt.

In der Zwischenzeit wird in der zweiten feuchten Kammer die Permeabilisierung der Zellen vorbereitet, d.h. nach dem Blocken legt man die Deckgläschen für 5 min auf einen Tropfen aus 0,1 %-igem Triton X. Dann werden die Gläschen wiederum sechsmal in PBS gewaschen und anschließend für 45 min mit dem Primärantikörper inkubiert.

Dieser wird meist im Verhältnis 1:100 in PBS und 10 %-igem FBS gelöst. Nach neuerlichem Waschen erfolgt dann die Behandlung für 30 min mit dem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper. Auch dieser wird in PBS und 10 %-igem FBS gelöst. Weiterhin ist er mit Fluorescein gekoppelt, wodurch später die Nachweisreaktion unter dem Mikroskop durch Immunfluoreszenz erfolgen kann.

Nun gibt man ein bis zwei Tropfen Moviol auf den Objektträger. Nach weiterem sechsmaligen Waschen und Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit werden die Deckgläschen mit der Zellseite auf das Moviol gelegt und somit eingebettet.

Anschließend lässt man die Objekte 10 bis 20 min trocknen, dichtet die Deckgläschen mit Klarlack ab und betrachtet die Immunfluoreszenz unter dem Mikroskop.

### **2.2.8 Proliferationsnachweis mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation**

Die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation dient als Indikatormethode für DNA-Synthese und Zellproliferation [136, 137].

Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz werden die Zellen trypsinisiert, in entsprechendem Medium aufgenommen und durch kräftiges Schütteln gleichmäßig suspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer werden je nach Versuchsaufbau  $10 \times 10^3$  bis  $20 \times 10^3$  Zellen in 200  $\mu$ l Medium in die entsprechenden Kammern einer „96-Well-Platte“ pipettiert. Die Aussaat erfolgt nur in die inneren Kammern der Platte, wobei die Kammern an den Rändern der Platte mit PBS, Aquabidest oder lediglich Medium befüllt werden. Dies gewährleistet störungsfreies Wachstum auch bei den Randbedingungen und führt zu gleichen Umgebungsbedingungen innerhalb einer Platte.

Nach einer Kultivierungszeit von 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank werden die Zellen mittels Hungermedium-Zugabe für 24 h synchronisiert und anschließend für weitere 24 h stimuliert. Einzelne Stimulationsbedingungen beziehen sich dabei auf je ein sog. Triplikat auf der Platte, um die Fehlerstreuung zu minimieren.

Für die letzten 4 h der Stimulationsperiode werden 5  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben. Anschließend wurde die Platte in einem sog. „cell harvester“ gewaschen, die Zellen

vom Boden der Platte abgelöst und die Lysate auf einen kleinporigen Whatmann-Fiberglass-Filter transferiert. Durch das Waschen wird lediglich das in die Zellen inkorporierte [<sup>3</sup>H]-Thymidin auf dem Filter festgehalten. Der radioaktive Zerfall der einzelnen Kammern kann nun in einem Flüssigszintillationszähler gemessen werden.

### **2.2.9 Plasmidamplifikation in Escherichia coli**

Plasmide wurden durch sog. Transformation amplifiziert. Dabei werden in einem 15 ml-Reaktionsgefäß 80 µl Wasser, 10 µl 0,3 M CaCl<sub>2</sub> und etwa 0,5 µl des Plasmids mit 40 µl chemisch kompetenten E. coli, sog. XL-1-blue, angesetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach weiteren 5 min im 42°C-Wasserbad und einminütiger Inkubation auf Eis wird 1 ml Soc- bzw. LB-Medium zugegeben und die Mischung 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird alles in ein 2 ml-Reaktionsgefäß übertragen und kurz zentrifugiert. Man nimmt 900 µl Überstand ab und resuspendiert den Bodensatz mit den restlichen 100 µl Flüssigkeit. 50 µl der Lösung werden auf mit Selektionsantibiotika (meist Ampicillin oder Kanamycin) behandelten LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können die Platten bei 4°C gelagert werden oder einzelne Kolonien gepickt werden und diese über Nacht mittels Selektionsantibiotika und LB-Medium auf dem Schüttler expandiert werden. Nach Zentrifugieren bei 6000 x g für 15 min bei 4°C und Abnahme des Überstandes kann der Bodensatz bei -20°C vorübergehend gelagert werden.

### **2.2.10 Plasmid-DNA-Aufreinigung**

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienkulturen erfolgte mit dem „Plasmid DNA Purification“-Kit „NucleoBond“ der Firma Macherey-Nagel.

Die nach der Transformation eingefrorenen Bakterienzellen werden in 4 ml S1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur gibt man 4 ml S2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) für die alkalische Lyse zu, wodurch sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA denaturiert werden. Das Gemisch wird 6-8-mal invertiert und für zwei bis drei Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Heftiges Schütteln sollte vermieden werden, um die Suspension nicht mit chromosomaler DNA der zellulären Fraktion zu kontaminieren. Durch Zugabe von S3-Puffer (2,8 M KAc, pH 5,1) kommt es zur Fällung der chromosomalen DNA und anderer zellulärer Bestandteile, sowie zur Neutralisierung des Lysates. Dazu wird die Suspension bis zur Präzipitatbildung mehrmals invertiert, anschließend für 5 min auf Eis gelegt und 15 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Inzwischen wird eine Säule mit N2-Puffer ( 100 mM Tris, 15 % EtOH, 900 mM KCl, 0,15 % Triton X-100, pH 6,3 eingestellt mit  $H_3PO_4$  ) aequilibriert und ein Filter aufgesetzt. Man gibt das Lysat auf die Säule und wäscht die Säule zweimal mit 5 ml N3-Puffer ( 100 mM Tris, 15 % EtOH, 1,15 M KCl, pH 6,3 eingestellt mit  $H_3PO_4$  ). Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird nun mit 5 ml N5-Puffer ( 100 mM Tris, 15 % EtOH, 1 M KCl, pH 8,5 eingestellt mit  $H_3PO_4$  ) in ein Reaktionsgefäß eluiert. Durch Zugabe von maximal der gleichen Menge an Isopropanol wird das Eluat präzipitiert, dann 30 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wird zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur und 15000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einer Trockenzeit von 5 bis 10 min wird die Plasmid-DNA in sterilem, deionisiertem Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm. Darüber hinaus wird die Integrität des Plasmids über Agarose-Gelelektrophorese geprüft.

### **2.2.11 Restriktionsenzymverdau**

Um die Integrität von Plasmiden bei der Agarose-Gelelektrophorese prüfen zu können, wird die doppelsträngige DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen linearisiert. Anhand der DNA-Sequenz der Plasmide versucht man, an sog. „unique cloning sites“ zu schneiden. So lassen sich gezielt Fragmente bekannter Länge gewinnen.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

1. 1 µg Plasmid-DNA
2. 1-3 Units Restriktionsendonuklease

3. 10% des Endvolumens an zur Endonuklease gehörigen Puffer
4. Auffüllen auf 10-20 µl mit Aquabidest
5. Verdau für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur

### **2.2.12 RNA-Extraktion**

Um Gesamt-RNA aus Zellsuspensionen zu extrahieren, wurde das „peqGOLD RNAPure“-Kit von peqLab Biotechnologie GmbH verwendet. Das Verfahren setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

1. Homogenisieren: 1,0 ml „peqGOLD RNAPure™ + 50 – 100 mg Probe
2. Phasentrennung: Homogenat + 0,2 ml Chloroform
3. RNA-Präzipitation: wässrige Phase + 0,5 ml Isopropanol
4. Waschen der RNA: 1 ml 75 %-iges EtOH
5. Lösen der RNA: Formamid, 0,5 % SDS oder RNase-freies Wasser

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm.

### **2.2.13 DNA-Amplifikation mittels Reverse-Transkriptase-PCR ( RT-PCR )**

#### **2.2.13.1 Gewinnung von komplementärer DNA ( cDNA )**

Aus Gesamt-RNA wurde mittels definierter Primer und reverser Transkriptase eine spezifische komplementäre DNA-Sequenz gewonnen.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

1. 5 µg Gesamt-RNA ( maximal RNA für 10 µl Volumen )
2. 1 µl Primer ( antisense )
3. 5 min bei 70°C ( Denaturieren )
4. auf Eis
5. 4 µl Puffer
6. 1 µl RNase-Inhibitor

7. 2 µl Nukleotide
8. 2 µl reverse Transkriptase
9. 30-60 min bei 37°C

### **2.2.13.2 Polymerase-Kettenreaktion ( PCR )**

Durch Polymerase-Kettenreaktion wird cDNA für gelelektrophoretische Untersuchungen amplifiziert.

Zunächst erstellt man einen sog. „Master-Mix“ mit folgenden Ingredienzen:

1. 1 µl Nukleotid
2. 1 µl Primer ( sense )
3. 1 µl Primer ( antisense )
4. 2,5 µl 10x-Puffer
5. 3 µl MgCl<sub>2</sub> ( 3 mM )
6. Auffüllen mit 10,5-11 µl Aquabidest

Das Endvolumen des „Master-Mixes“ bestimmt sich aus obigem Volumen multipliziert mit der Anzahl an Proben plus eins.

Nach Zugabe von 5 µl Taq-Polymerase wird der „Master-Mix“ in PCR-Reaktionsgefäße mit jeweils 25 µl Volumen aliquotiert und in die einzelnen Proben je 1 µl cDNA pipettiert. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

1. 1 min Annealing bei 55°C
2. 1 min Synthese bei 72°C
3. 20 sek Denaturieren bei 94°C

### **2.2.14 Analyse von DNA in Agarosegelen**

Entsprechend der jeweiligen Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wurden 0,5 - 2%-ige Agarosegele verwendet. Für ein 1%-iges Agarosegel wurde 1 g Agarose in



100 ml TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und anschließend in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die in DNA-Probenpuffer aufgenommene DNA wurde bei 100 V elektrophoretisiert. Danach konnte die DNA unter UV-Licht analysiert und darüberhinaus photographiert werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Zelllinie p8-INS-1

##### 3.1.1 Die Zelllinie INS-1 als Modell der beta-Zelle des endokrinen Pankreas

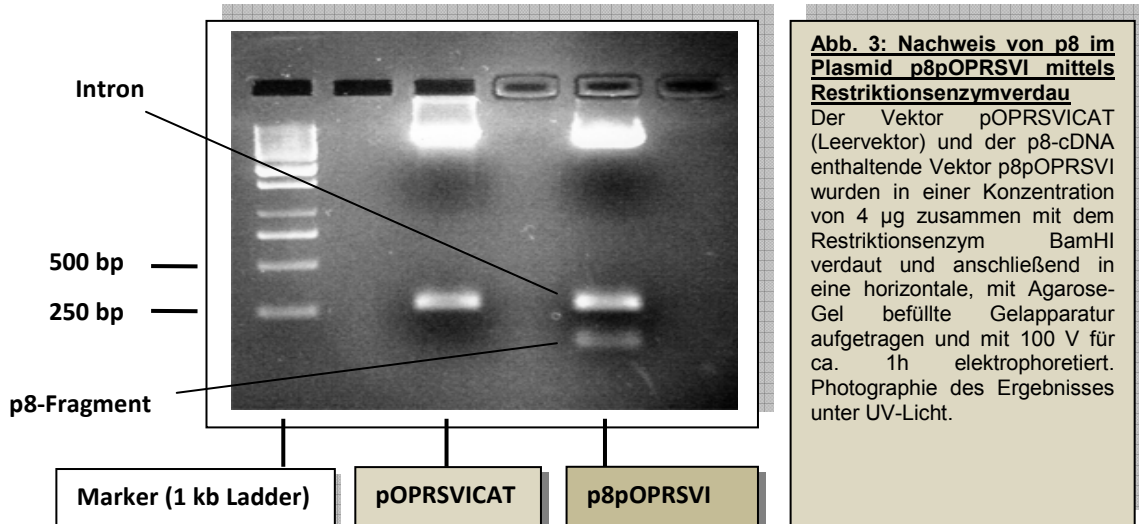
Der Ersatz von Insulin produzierenden beta-Zellen des endokrinen Pankreas ist das vorrangige Ziel der Pankreas-Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. Leider steht dem breiten Einsatz dieser Therapie ein Mangel an Spenderorganen entgegen. Daher ist die Identifikation von Faktoren notwendig, mit deren Hilfe beta-Zellen oder auch ihre Vorläufer expandiert werden können. Als Grundlage derlei Studien und auch der vorliegenden Arbeit dient die Zelllinie INS-1, im folgenden Wildtyp-INS-1-Zellen oder WT-INS-1-Zellen genannt (siehe auch 2.1.7).

WT-INS-1-Zellen imitieren die Funktion einer normalen beta-Inselzelle des endokrinen Pankreas und können somit helfen, die Funktionsweise einer Pankreas-Inselzelle verstehen zu lernen und können unter Umständen als Surrogat für die Expansion von insulinsezernierenden Zellen dienen [138].

##### 3.1.2 Das p8-überexprimierende Plasmid

Um nun die Rolle von p8 näher untersuchen zu können, wurden Wildtyp-INS-1-Zellen (WT-INS-1) mit einem induzierbaren, p8-exprimierenden System ausgestattet. Dabei handelt es sich in der Grundkonstruktion um das sog. „LacSwitch inducible mammalian expression system“<sup>®</sup> der Fa. Stratagene (siehe auch 2.2.6).

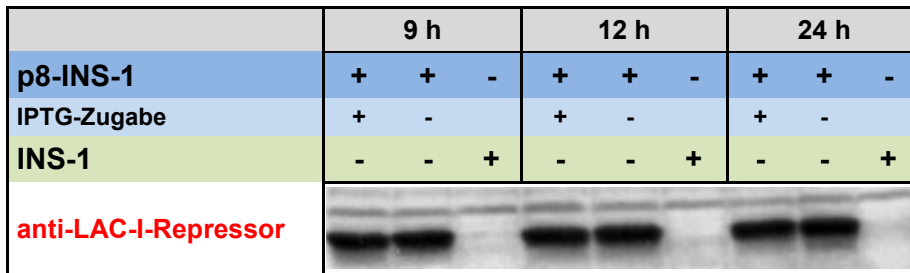
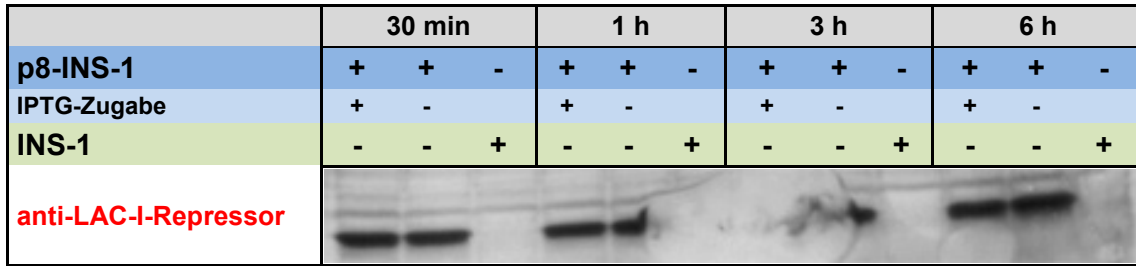
Um das Expressionskonstrukt der p8-INS-1-Zellen zu bestätigen, wurde der Nachweis von p8-cDNA in obigem Vektor geführt. Hierzu wurden der Leervektor pOPRSVICAT und der p8-cDNA enthaltende Vektor p8pOPRSVI mittels Restriktionsenzymverdau behandelt, um das p8-Fragment herauszuschneiden. Es handelte sich dabei um das Restriktionsenzym BamHI, welches ausschließlich das p8-Fragment aufgrund der „unique splicing site“ der p8-cDNA herauslösen konnte. Anschließend erfolgte Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der einzelnen Fragmente und Darstellung unter UV-Licht (Abb. 3).



### 3.1.3 Kontrolle der p8-Expression in p8-INS-1-Zellen

Im nächsten Schritt wurde das den p8-INS-1-Zellen zugrunde liegende Expressionskonstrukt p8pOPRSVI mittels Immunoblotanalyse überprüft.

p8-INS-1-Zellen und Wildtyp-INS-1-Zellen wurden für 0h, 3h, 6 h, 9h, 12h, und 24h in glukose- und wachstumsfaktorfreiem Hungermedium belassen und anschließend mittels Immunoblot, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Hierbei konnte der Lac-Repressor einzig bei p8-INS-1-Zellen im Vergleich zur Wildtypreihe der INS-1-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Nachweis des LAC-Repressors in p8-INS-1-Zellen**

p8-INS-1-Zellen und INS-1-Zellen wurden mittels Hungermedium auf gleiches Stoffwechsellniveau gebracht. Anschließend wurde einer Hälfte der p8-INS-1-Zellen IPTG zur p8-Überexpression zugegeben. Überdies wurden alle Zellen mit 6 mM Glukose und foetalem Kälberserum (FBS) für unterschiedliche Zeitperioden stimuliert (30 min, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h). Die Zellysate wurden mittels Western Blot aufgetrennt, die Detektion erfolgte mit anti-LAC-I-Repressor-Antikörper.

Sodann erfolgte der Nachweis von p8-cDNA mit molekulargenetischen Methoden. Untersucht wurden zum einen die vorliegenden, bereits in Kultur gehaltenen und stabil transfizierten p8-INS-1-Zellen und zum anderen Wildtyp-INS-1-Zellen, welche transient mit dem Plasmid p8pOPRSVI transfiziert wurden.

Bezüglich letzteren Verfahrens musste zunächst das Plasmid in Escherichia coli durch Transformation amplifiziert werden und die Plasmid-DNA anschließend aufgereinigt werden (siehe auch 2.2.9 und 2.2.10). Via Elektroporation wurde p8pOPRSVI in WT-INS-1-Zellen transfiziert. Nach Transfektion wurden diese Zellen zu einem Teil in der Zellkultur mit IPTG zur Überexpression von p8 angeregt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation geerntet (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 24h). Der andere Teil der Zellen erhielt kein IPTG, wurde aber sonst zu gleichen Bedingungen behandelt.

Nun folgten zwei Nachweismethoden. Die eine konzentrierte sich auf den Nachweis von p8-cDNA in stabil transfizierten p8-INS-1-Zellen und in den obig beschriebenen

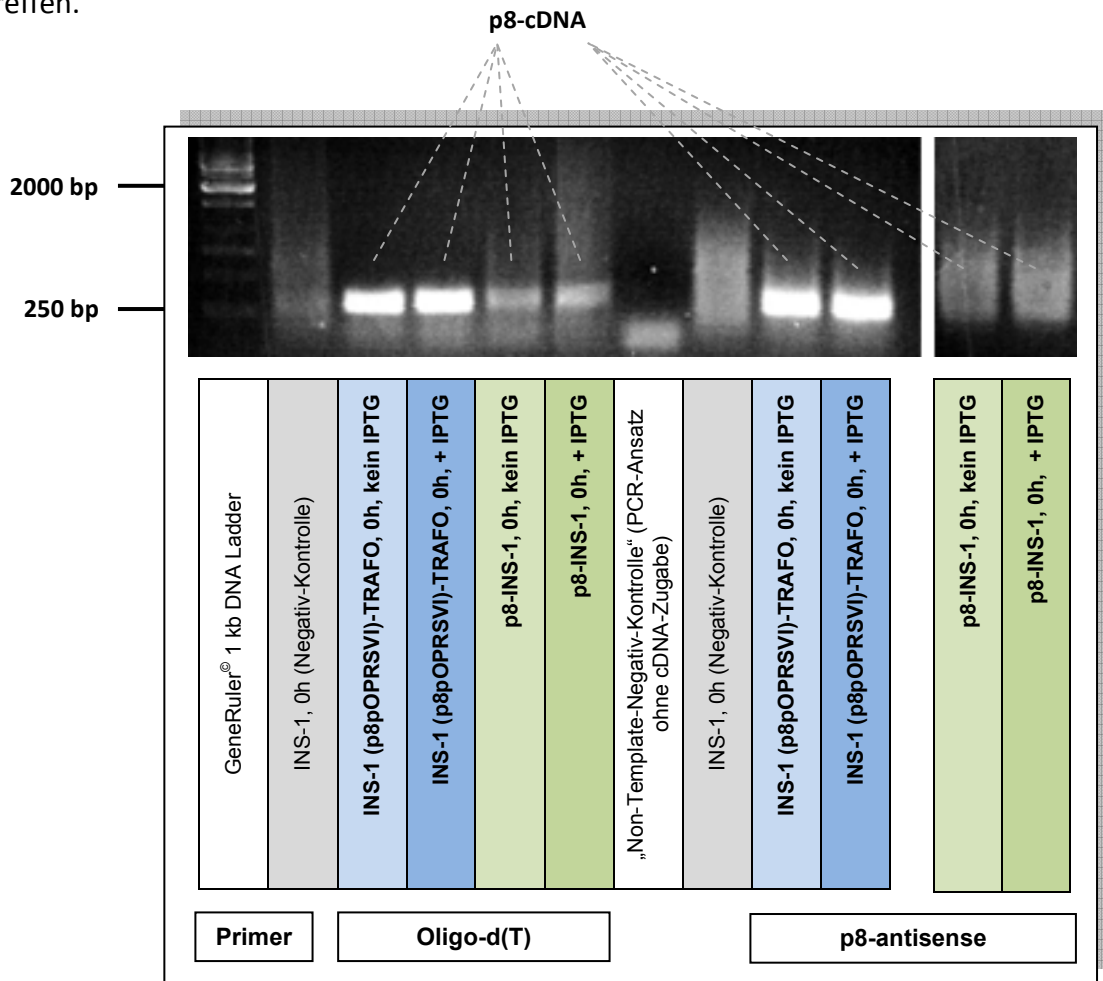
transient transfizierten INS-1-Zellen. Die andere Methode sollte schließlich per Immunoblot-Analyse p8-Protein in beiden Zelllinien nachweisen.

Für die Analyse der p8-cDNA in den beiden Zelllinien wurden p8-INS-1-Zellen jeweils mit und ohne IPTG-Zugabe behandelt („p8-INS-1, 0h, +/- IPTG“). Bei den INS-1-Zellen wurden die gleichen Stimulationsbedingungen gewählt („INS-1-(p8OPRSVI)-Trafo, 0h, +/- IPTG“). Desweiteren wurden zur Kontrolle WT-INS-1-Zellen ohne Zugabe von Stimuli verwendet („INS-1, 0h“).

Als erstes musste die Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellsuspensionen extrahiert werden. Dann konnte aus der Gesamt-RNA mittels definierter Primer und reverser Transkriptase die spezifische komplementäre p8-cDNA-Sequenz gewonnen werden. Diese wurde im Anschluss durch Polymerase-Kettenreaktion für gelelektrophoretische Untersuchungen amplifiziert (siehe hierzu 2.2.13). Als Primer wurden einerseits ein Oligo-d(T)-Primer als Komplementär des Poly-A-Schwanzes der mRNA am 3'-Ende und andererseits ein p8-antisense-Primer als Gen-spezifischer Primer verwendet. Als „Non-Template“-Negativ-Kontrolle fungierte der komplette Ansatz der RT-PCR ohne Zugabe von cDNA.

In Abb. 5 stellt sich deutlich p8-cDNA dar, wobei das stärkste Signal in den WT-INS-1-Zellen mit transients Transfektion des p8OPRSVI-Plasmids auftritt. Und dies sowohl in den mit Oligo-d(T)-Primer als auch in den mit genspezifischem p8-antisense-Primer behandelten Proben. Die stabil transfizierten p8-INS-1-Zellen verhalten sich weniger eindeutig. Das Signal der Proben erscheint abgeschwächt gegenüber den transient transfizierten WT-INS-1-Zellen und deutet somit auf eine geringere Expression von p8-mRNA hin. Dies spiegelt sich auch bei den mit Gen-spezifischem p8-antisense-Primer behandelten Proben der p8-INS-1-Zellen wider. Aufgrund der geringeren nativen p8-mRNA-Menge kann scheinbar weniger p8-cDNA gewonnen werden mit in der Folge uneindeutiger Signalgebung.

Die Aussage einer quantitativ höheren Ausbeute an p8-cDNA durch die IPTG-Gabe lässt sich weder bei transient noch bei stabil transfizierten INS-1- respektive p8-INS-1-Zellen treffen.



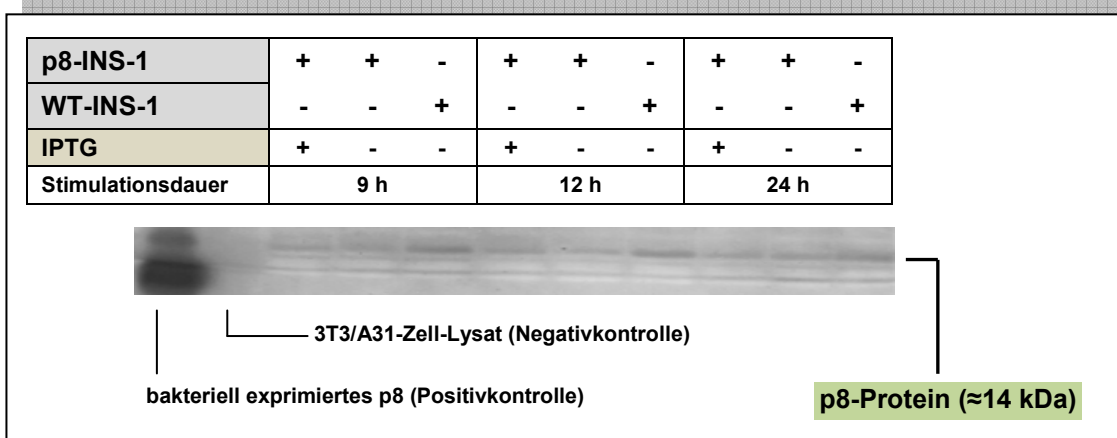
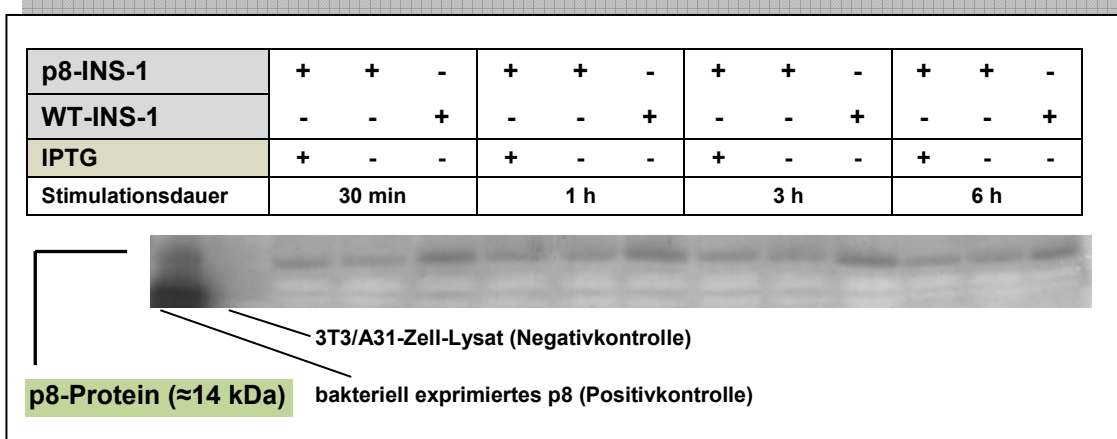
**Abb. 5: Nachweis von p8-cDNA**

p8-INS-1-Zellen und transient mit p8pOPRSVI-Plasmid transfizierte WT-INS-1-Zellen wurden z.T. mit IPTG stimuliert. Anschließend wurde eine PCR mit Reverse Transkriptase (RT-PCR) durchgeführt. Als Primer wurden Oligo-d(T) und p8-antisense verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel Photographie des Ergebnisses unter UV-Licht. (Dargestellt ist der Lauf in der oberen und unteren Kammer einer Gelapparatur, beide mit demselben Marker bestückt).

Nachdem sich nun die transiente Transfektion des Plasmids p8pOPRSVI in Wildtyp-INS-1-Zellen und auch das Vorhandensein des Plasmids in den stabil transfizierten p8-INS-1-Zellen erfolgreich darstellen ließen, sollte sich p8 auch auf Proteinebene per Immunoblotanalyse nachweisen lassen.

Hierzu wurden p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen mit 6 mM Glukose und foetalem Kälberserum (FBS) für unterschiedliche Zeitperioden stimuliert (30 min, 1 h, 3 h, 6 h,

9 h, 12 h, 24 h). Anschließend erfolgte die Detektion von p8-Protein in den einzelnen Zelllysaten mittels anti-p8-Antikörper im Rahmen der Immunoblotanalyse (Abb. 6).



**Abb. 6: Nachweis von p8-Protein in p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen**

p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen wurden für 24 h in Hungermedium synchronisiert und anschließend für unterschiedliche Zeitperioden stimuliert (30 min, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h). Zur Stimulation wurde 6 mM Glukose und ein 10%-iger Anteil an foetalem Kälberserum (FBS) zugegeben. Zudem wurde ein Teil der p8-INS-1-Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression behandelt. Anschließend wurden die Lysate der einzelnen Zellproben mittels Western Blot nach Molekulargewicht aufgetrennt. Detektion erfolgte mit anti-p8-Antikörper.

Was sich zu diesem Zeitpunkt konstatieren lässt, ist die Tatsache dass die p8-Überexpression (IPTG-Gabe) innerhalb der p8-INS-1-Zellen im Vergleich zu den nicht mit IPTG behandelten p8-INS-1-Zellen zu einem stärkeren, wenn auch nicht sehr ausgeprägten Signal des ca. 14 kDa großen p8-Proteins im Bereich von 30 min bis 12 h führt. Nach 24-stündiger Stimulation kommt es zu keiner weiteren Signalanhebung. Das Expressionskonstrukt des Plasmids p8pOPRSVI erzeugt also über IPTG-Gabe erhöhte p8-mRNA-Spiegel, was zu erhöhter p8-Proteinexpression führt.

Jedoch fällt auf, dass erneut ein generell stärkeres Signal bei den WT-INS-1-Zellen gegenüber den p8-INS-1-Zellen auftritt. Dieses Ergebnis verblüfft zunächst, zumal in den Arbeiten von Martin Gehlen et al. aus unserer Arbeitsgruppe in p8-INS-1-Zellen eine 5-fach höhere p8-mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtyp-INS-1-Zellen nachgewiesen wurde und somit auch stärkere p8-Protein-Expressionen zu erwarten wären [116].

Es ging nun also darum, die Ursache dieses Phänomen näher zu beleuchten. Bei mehreren Immunoblotanalysen fiel auf, dass es äußerst schwierig ist, p8-Protein überhaupt zu detektieren. Einerseits besitzt das Protein p8 ein niedriges Molekulargewicht von knapp 14 kDa, was allein schon das Laufverhalten im Gel und auch den Transfer auf die Membran beeinflusst. Und andererseits waren zu Beginn der Arbeit die optimalen Stimulationsbedingungen für die Expression von p8-Protein noch nicht klar. Bekannt war zu diesem Zeitpunkt eine glukoseabhängige p8-mRNA-Expression [116], sowie eine Expression im Rahmen einer Stressantwort [76].

An diesem Punkt stellte sich die Frage, was nach der p8-mRNA-Expression in der Signaltransduktion der beta-Zelle des endokrinen Pankreas geschieht. Kommt es relativ schnell zu kovalenten Protein-Protein-Bindungen von p8 mit anderen Interaktionspartnern? Ist p8 insgesamt eher instabil oder wird die Quantität des Proteins durch inhibitorische Vorgänge reguliert? Wird p8 phosphoryliert und erhält so ein höheres Molekulargewichtes oder kommt es möglicherweise zur Degradation von p8-Protein?

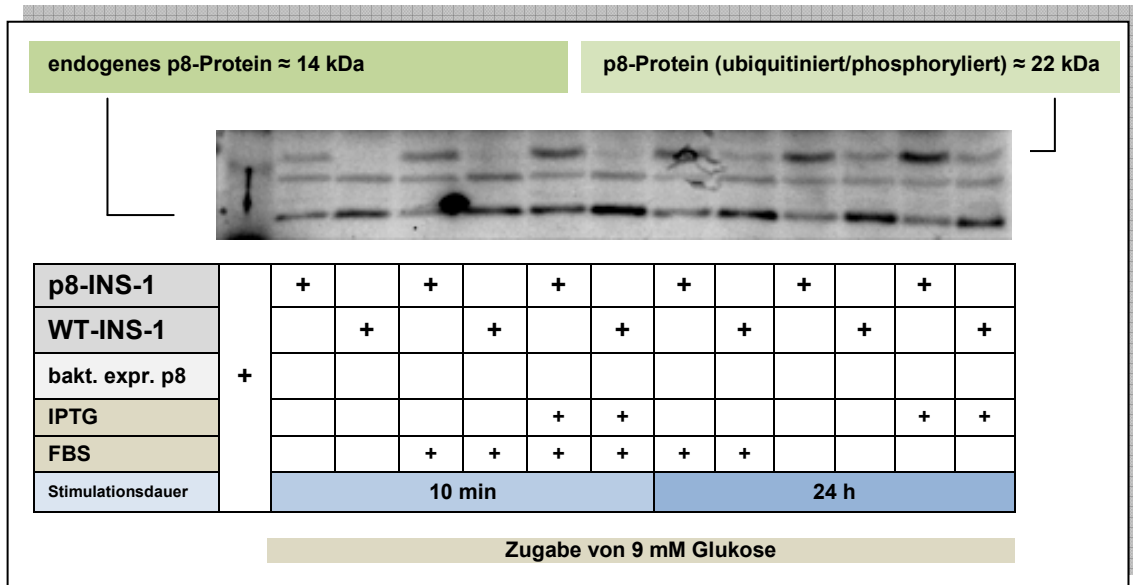
Denn teilweise waren bei einzelnen Immunoblotanalysen Doppelbanden zu beobachten. Beispielhaft sei folgende Abbildung (Abb. 7) näher erläutert.

p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen wurden nach der Synchronisation für 10 min und für 24 h mit 9 mM Glukose stimuliert. Zusätzlich erhielt ein Teil der Zellen FBS und/oder IPTG.

Es zeigt sich nun wiederum ein stärkeres Signal des p8-Proteins bei den WT-INS-1-Zellen im Vergleich zu p8-INS-1-Zellen (endogenes p8-Protein bei  $\approx$  14 kDa). Interessanterweise führt dabei die Gabe von Wachstumsfaktoren auch zu einer Signalanhebung bei den WT-INS-1-Zellen. Nebenbefundlich wirkt sich IPTG dabei nicht



hemmend auf die p8-Expression bei den WT-INS-1-Zellen aus (vgl. WT-INS-1-Zellen: +IPTG/+FBS vs. -IPTG/+FBS bei 10 min und +IPTG/-FBS vs. -IPTG/-FBS bei 24 h).



**Abb. 7: Nachweis von p8-Protein in p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen**

p8-INS-1-Zellen und WT-INS-1-Zellen wurden für 24 h in Hungermedium synchronisiert und anschließend für 30 min und 24 h stimuliert. Zur Stimulation wurde 9 mM Glukose und bei einem Teil der Zellen ein 10%-iger Anteil an foetalem Kälberserum (FBS) zugegeben. Zudem wurde ein Teil der p8-INS-1-Zellen und auch der WT-INS-1-Zellen mit IPTG behandelt. Anschließend wurden die Lysate der einzelnen Zellproben mittels Western Blot nach Molekulargewicht aufgetrennt. Detektion erfolgte mit anti-p8-Antikörper.

Doch eindrücklicher wirken die Doppelbanden, die sich bei ca. 22 kDa abbilden. Im kurzfristigen Stimulationsbereich bei 10 min treten sie vorwiegend bei den p8-INS-1-Zellen auf, bei langfristiger Stimulation für 24 h erscheinen die Banden zusätzlich bei den WT-INS-1-Zellen. Bei den p8-INS-1-Zellen werden die Banden unter Zugabe von FBS und IPTG im Stimulationsbereich von 10 min zunehmend stärker. Nach Stimulation für 24 h wird mit IPTG-Gabe ein stärkeres Signal als bei alleiniger Glukosegabe erreicht. Die zusätzliche FBS-Gabe ohne IPTG-Zusatz kann keine Verstärkung des Signals im Vergleich zur IPTG-Gabe generieren. Die WT-INS-1-Zellen weisen bei ca. 22 kDa im kurzfristigen Bereich ein schwaches Signal unter FBS-Gabe und im langfristigen Bereich ein gegenüber den p8-INS-1-Zellen zwar schwächeres, aber durchaus deutliches Signal

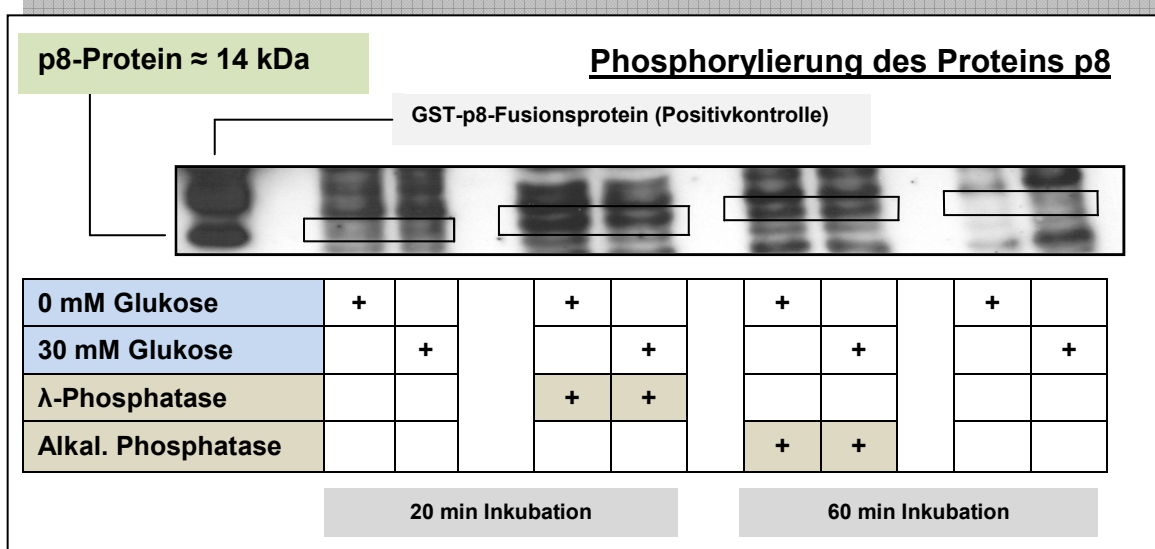
auf, welches hierbei keine eindeutige Abhängigkeit von der Gabe an Stimulationsfaktoren erkennen lässt.

Zusammengefasst kann endogenes Protein p8 nachgewiesen werden, wobei in WT-INS-1-Zellen trotz der p8-mRNA-Überexpression in p8-INS-1-Zellen ein deutlich stärkeres Signal auftritt. Demgegenüber führt die erhöhte p8-mRNA-Expression zur Ausbildung zusätzlicher und auch signalstärkerer Banden bei ca. 22 kDa. Dies tritt vornehmlich im kurzfristigen Stimulationsbereich von 10 min zutage. Verlängert man die Stimulationsdauer auf 24 h, erscheinen auch bei den WT-INS-1-Zellen in schwächerem Ausmaße als bei den p8-INS-1-Zellen zusätzliche Banden bei ca. 22 kDa. Das könnte bedeuten, dass nur eine bestimmte Menge an p8-Protein in der Zelle „nativ“ mit 14 kDa vorliegen kann und eine vermehrte Stimulation, und damit auch stärkere Expression, zur Erhöhung des Molekulargewichts auf 22 kDa führt. Es scheint somit Mechanismen zu geben, die „natives“ p8-Protein verändern, sei es beispielsweise durch Phosphorylierungen oder aber auch durch Ubiquitinierungen.

### **3.1.4 Protein p8 wird phosphoryliert**

Zum Nachweis möglicher Phosphorylierungen wurden WT-INS-1-Zellen für 24 h mit 0 mM Glukose bzw. 30 mM Glukose stimuliert. Aus den gewonnenen Zelllysaten wurde jeweils 50 µg Gesamtprotein entnommen, welches für 20 min mit  $\lambda$ -Phosphatase oder für 60 min mit Alkalischer Phosphatase oder ohne Zugabe von Phosphatasen bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben mittels Immunoblotanalyse untersucht.

So lässt Abb. 8 erkennen, dass die ohne Phosphatasen behandelten Proben ein schwaches p8-Signal generieren, während bei denjenigen Proben, welche einer Phosphatasebehandlung unterlagen, deutliche Banden hervortreten. Protein p8 unterliegt also ständigen Phosphorylierungen und somit Änderungen des Molekulargewichts.



**Abb. 8: Protein p8 wird phosphoryliert**

WT-INS-1-Zellen wurden für 24 h in Hungermedium synchronisiert und anschließend für 24h mit 0 mM oder 30 mM Glukose stimuliert. Jeweils 50 µg Protein der gewonnenen Lysate wurden für ca. 20 min mit λ-Phosphatase oder für 60 min mit Alkal. Phosphatase oder ohne Phosphatase-Zugabe bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate der einzelnen Zellproben mittels Western Blot nach Molekulargewicht aufgetrennt. Detektion erfolgte mit anti-p8-Antikörper.

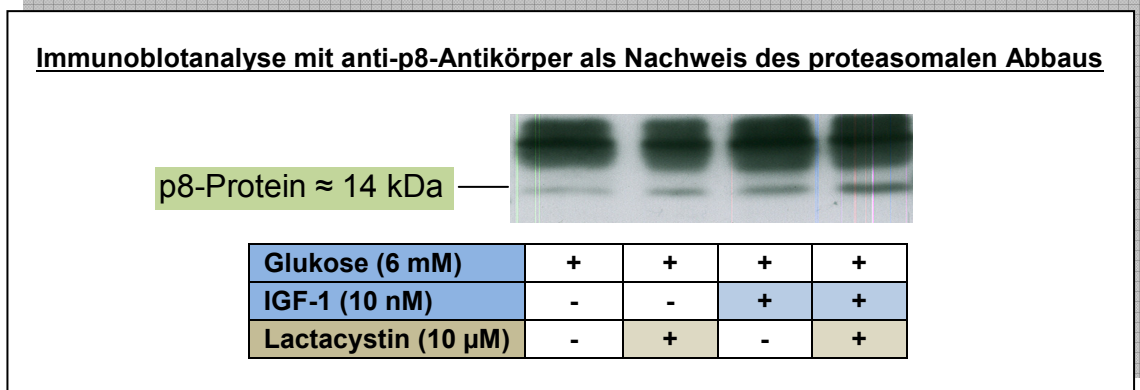
### 3.1.5 Protein p8 wird ubiquitiniert und unterliegt einem schnellen Abbau im Proteasom

Um nun die Theorie der schnellen Degradation durch das Ubiquitin/Proteasom-Systems zu bestätigen, wurden zwei verschiedene methodische Ansätze verfolgt: die Immunoblotanalyse und die Proliferationsanalyse mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation.

Wildtyp-INS-1-Zellen wurden für 24 h mit 6 mM Glukose und 10 nM IGF-1 stimuliert. Für die letzten 4 h wurde 10 µM Lactacystin zugegeben, um das Proteasom und somit den Abbau von Protein p8 zu hemmen. Nach Auftrennung der Lysate mittels Western Blot erfolgte die Detektion mit anti-p8-Antiserum.

In Abb. 9 wird schnell deutlich, dass es auf Proteinebene unabhängig von der Proteasomhemmung zu einer stärkeren p8-Expression kommt, wenn neben Glukose noch IGF-1 zugegeben wird.

Wird nun das Proteasom darüber hinaus gehemmt, verstärkt sich die p8-Expression der jeweiligen Bedingungen. Die stärkste p8-Expression lässt sich bei 6 mM Glukose + 10 nM IGF-1 + 10 µM Lactacystin nachweisen.



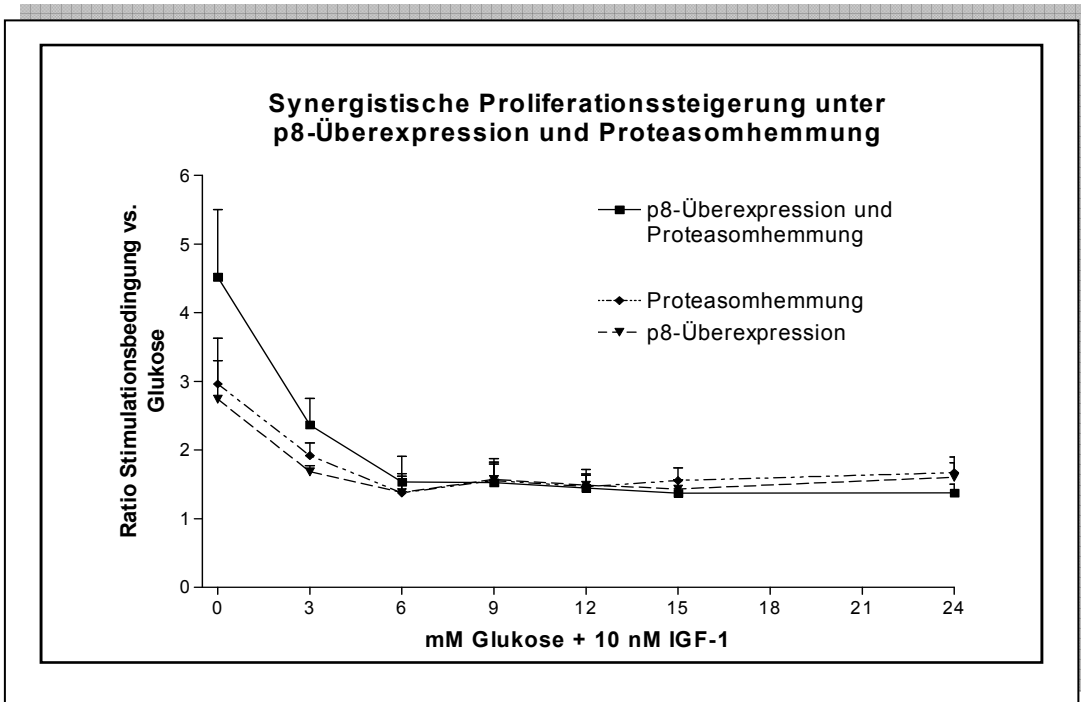
**Abb. 9: Protein p8 wird ubiquitiniert und unterliegt einem schnellen Abbau im Proteasom**

WT-INS-1-Zellen wurden für 24 h in Hungermedium synchronisiert und anschließend für 24h mit 6 mM Glukose und 10 nM IGF-1 stimuliert. Für die letzten 4 h der Stimulation wurde Lactacystin zur Proteasomhemmung zugegeben. Anschließend wurden die Lysate der einzelnen Zellproben mittels Western Blot nach Molekulargewicht aufgetrennt. Detektion erfolgte mit anti-p8-Antkörper.

Hieraus kann nun abgeleitet werden, dass zum einen die Gabe von IGF-1 und zum anderen eine Hemmung des Proteasoms zu einer deutlichen p8-Expression führt, was sich schließlich zu einem synergistischen Effekt vereinigt.

Darüberhinaus konnte in der Folge gezeigt werden, dass die Proteasomhemmung durch Lactacystin durch die damit verbundene erhöhte p8-Expression auf Proteinebene außerdem die p8-abhängige Proliferation verstärkt.

Zur Untersuchung dieses Effekts wurden p8-INS-1-Zellen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM – 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Außerdem wurden die Zellen mit IPTG zur p8-Expression und/oder mit Lactacystin zur Proteasomhemmung behandelt. Das restliche Protokoll folgt der in „Material und Methoden“ beschriebenen [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation (2.2.8). Im Rahmen der Standardisierung wurden die mit Hilfe des Flüssigszintillationszählers ermittelten „counts per minute“ der einzelnen Versuchsbedingung zu den zugeordneten Glukosewerten ins Verhältnis gesetzt (z.B. 6 mM Glukose + IGF-1 + Lactacystin im Verhältnis zu 6 mM Glukose, Abb. 10).



**Abb. 10: Synergistische Proliferation durch p8-Überexpression und Proteasomhemmung:**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde IPTG zur p8-Überexpression und/oder Lactacystin zur Proteasomhemmung zugegeben. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose als x-facher Anstieg. Dargestellt ist das Verhältnis zwischen einzelner Stimulationsbedingung und entsprechender Glukosebedingung (z.B. 6 mM Glukose + IGF-1 + Lactacystin vs. 6 mM Glukose)

Somit erkennt man in Abb. 10, dass es gerade im Niedrigglukosebereich bzw. im glukosefreien Bereich zu verstärkter Proliferation kommt.

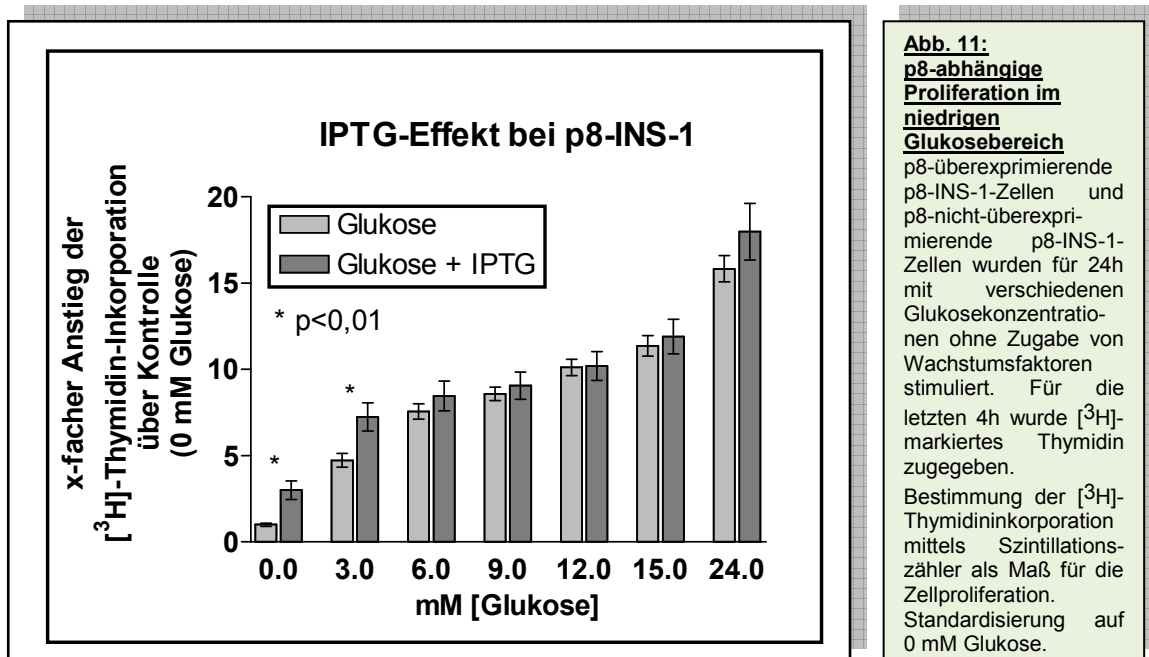
Die alleinige p8-Überexpression führt zu einer Proliferationssteigerung um das 2,7-fache (0 mM Glukose) und 1,7-fache (3 mM Glukose). Durch eine Proteasomhemmung können 3,0-fache (0 mM Glukose) und 1,9-fache (3 mM Glukose) Steigerungsraten erreicht werden.

Werden aber sowohl p8 überexprimiert als auch das Proteasom gehemmt, zeigt sich eine 4,5-fache Verstärkung der Proliferation im glukosefreien Bereich gegenüber der alleinigen Gabe von IGF-1. Dieses Wachstum wird mit steigenden Glukosekonzentrationen abgemildert (2,4-fach bei 3 mM Glukose). Ab dem physiologischen Bereich von 6 mM Glukose ergibt sich kein signifikanter Proliferationsvorteil.

### 3.1.6 Auswirkungen der p8-Überexpression auf das Proliferationsverhalten der p8-INS-1-Zellen

Wir haben nun gesehen, dass die Expression von p8 auf Proteinebene von mehreren Faktoren abhängig ist. Durch Phosphorylierungen und Ubiquitinierung würde sich erklären, warum p8-INS-1-Zellen unter den betrachteten Untersuchungsbedingungen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene schwächer bei knapp 14 kDa signalisieren als die WT-INS-1-Zellen. Die Frage ist hierbei, ob sich dieser Umstand auch auf das Proliferationsverhalten der Zellen auswirkt.

Im Weiteren wurde die Induzierbarkeit der p8-Expression in der p8-INS-1-Zellreihe näher betrachtet. Hierzu wurden p8-INS-1-Zellen, wie in Material und Methoden bezüglich der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation beschrieben (2.2.8), ausgesät und für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM, 15 mM, 24 mM) stimuliert. Eine Hälfte der Zellen wurde zusätzlich mit 5 mM IPTG behandelt, um die p8-Expression zu induzieren. In den letzten 4 h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin als Proliferationsmarker zugegeben und der radioaktive Zerfall anschließend mit Flüssigszintillationszähler in „counts per minute“ (cpm) bestimmt. Als Kontrolle dienten p8-INS-1-Zellen, die weder mit Glukose noch mit Wachstumsfaktor behandelt wurden. Die Ergebnisse wurden auf diese Kontrolle hin als x-facher Anstieg standardisiert (Abb. 11).



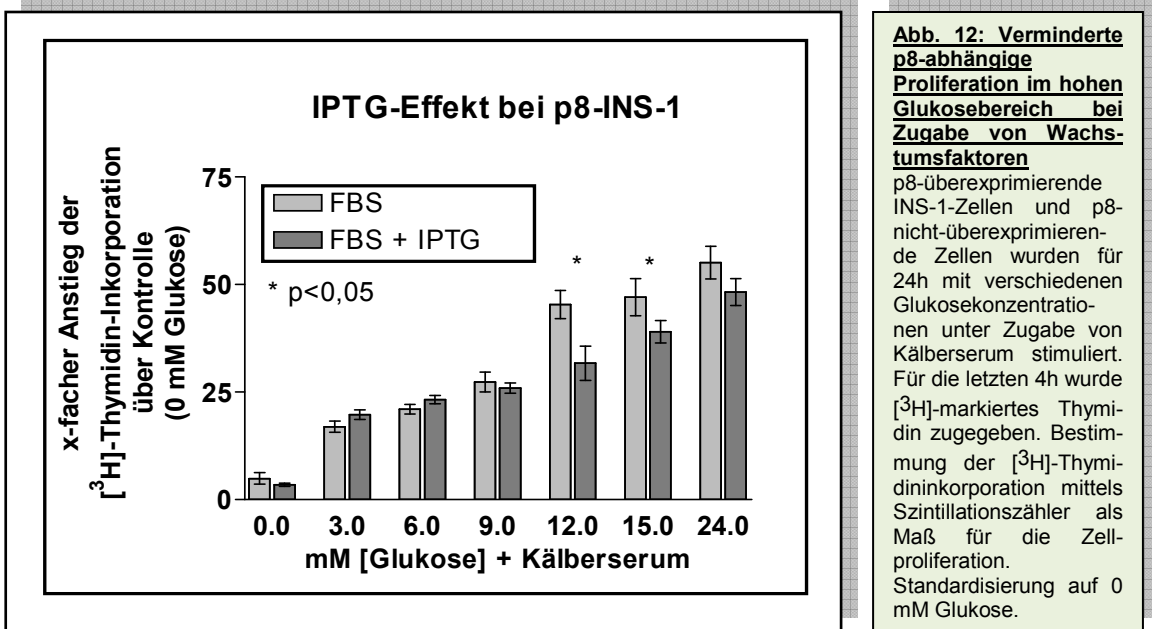
**Abb. 11:**  
**p8-abhängige**  
**Proliferation im**  
**niedrigen**  
**Glukosebereich**

p8-überexprimierende p8-INS-1-Zellen und p8-nicht-überexprimierende p8-INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukosekonzentrationen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren stimuliert. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben.

Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

Es zeigt sich unter p8-Expression mittels IPTG lediglich im niedrigen Glukosebereich bis 6 mM Glukose eine signifikant verstärkte Proliferation. Im physiologischen und suprphysiologischen Bereich bestehen keine signifikanten Unterschiede, welche man hinsichtlich eines funktionierenden Lac-Switch-Systems aber durchaus erwarten würde, d.h. mehr p8-Expression sollte auch mehr Proliferation erzeugen.

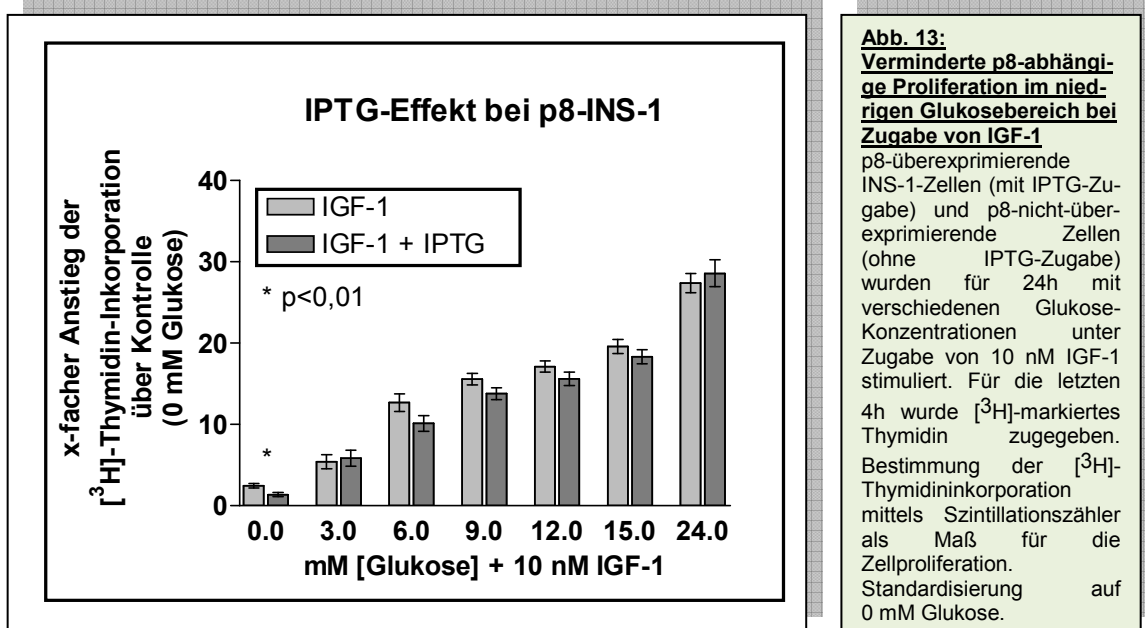
Stimuliert man die p8-INS-1-Zellen nun unter gleichen Versuchsbedingungen zusätzlich mit Kälberserum (FBS), welches verschiedene Wachstumsfaktoren enthält (siehe Abb. 12), oder dezidiert mit IGF-1 (siehe Abb. 13), erweist sich das Bild als noch uneinheitlicher.



**Abb. 12: Verminderte p8-abhängige Proliferation im hohen Glukosebereich bei Zugabe von Wachstumsfaktoren**  
 p8-überexprimierende INS-1-Zellen und p8-nicht-überexprimierende Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukosekonzentrationen unter Zugabe von Kälberserum stimuliert. Für die letzten 4h wurde  $[^3\text{H}]$ -markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der  $[^3\text{H}]$ -Thymidininkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

Unter Zugabe von Wachstumsfaktoren scheint die p8-Expression die Proliferation eher zu hemmen als sie zu verstärken. Unter FBS-Zugabe fällt die Proliferationsrate der p8-überexprimierenden p8-INS-1-Zellen im suprphysiologischen Glukosebereich (12 mM bis 24 mM) deutlich geringer aus. Der Anstieg über der Kontrolle mit glukose- und wachstumsfaktorfreier Zellbehandlung beträgt bei 12 mM Glukose und p8-Expression durch IPTG-Zugabe das 32-fache im Vergleich zu 45-facher Proliferation ohne p8-Expression. Bei 15 mM Glukose fällt der Unterschied mit 39-fach zu 47-fach weniger deutlich, aber dennoch signifikant aus (Abb. 12).

Gibt man andererseits unter weiter gleichen Versuchsbedingungen 10 nM IGF-1 als Wachstumsfaktor zu, gewinnt man auch eher den Eindruck einer verminderten Proliferationsrate unter p8-Expression im Vergleich zu nicht überexprimierten p8-INS-1-Zellen. Signifikant ist dieser Unterschied jedoch nur bei der reinen IGF-1-Gabe im glukosefreien Medium (0 mM Glukose). Hier erreichen p8-INS-1-Zellen ohne p8-Expression einen 2,4-fachen Anstieg über der glukose- und wachstumsfaktorfreien Kontrolle gegenüber einem 1,6-fachen Anstieg mit p8-Expression (Abb. 13).



**Abb. 13:**  
**Verminderte p8-abhängige Proliferation im niedrigen Glukosebereich bei Zugabe von IGF-1**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen (mit IPTG-Zugabe) und p8-nicht-überexprimierende Zellen (ohne IPTG-Zugabe) wurden für 24h mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen unter Zugabe von 10 nM IGF-1 stimuliert. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidininkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

Zusammengefasst lassen sich durch p8-Überexpression mit IPTG in Phasen erhöhten Zellstressses wie bei Behandlung mit glukosefreiem Zellmedium höhere Proliferationsraten gegenüber den nicht überexprimierenden Zellen feststellen. Bei für die Zellen gutem bzw. auch übermäßigem Nutritionsumfeld (supraphysiologische Glukosekonzentrationen und/oder Zugabe von Wachstumsfaktoren) scheint es eher zur Hemmung der Proliferation unter gleichzeitiger p8-Überexpression zu kommen. Sollte aber zugleich das Proteasom gehemmt werden, kann eine Überexpression an p8 dennoch eine Proliferationssteigerung im subphysiologischen Glukosebereich bei gleichzeitiger IGF-1-Gabe auslösen (siehe Abb. 10: Synergistische Proliferation durch p8-Überexpression und Proteasomhemmung).

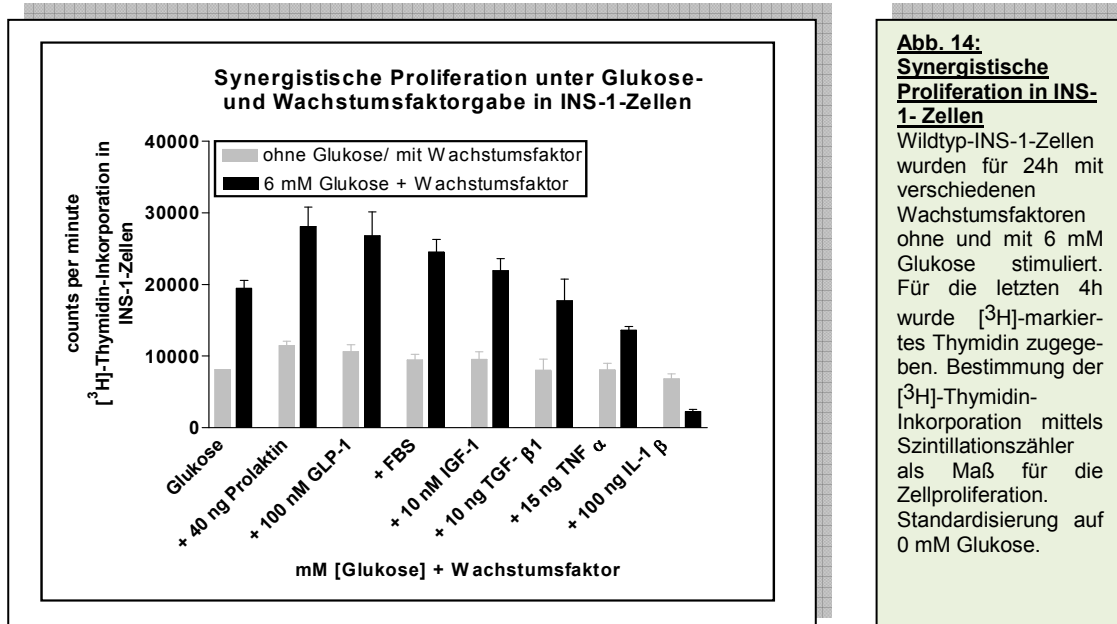


### 3.2 p8-vermittelte Zellproliferation ( $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation)

#### 3.2.1 Identifikation von Wachstumsfaktoren der beta-Zelle im zugrundeliegenden Modell

Zur Testung der Modellreihe und des Versuchsaufbaus wurden die nicht transfizierten WT-INS-1-Zellen mit diversen Wachstumsfaktoren behandelt (FBS, Prolaktin, IGF-1, GLP-1, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Hierbei wurden Wildtyp-INS-1-Zellen im Rahmen der  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporationsmethode zum einen mit diversen Wachstumsfaktoren allein (FBS, Prolaktin, IGF-1, GLP-1, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und zum anderen unter zusätzlicher Gabe von 6 mM Glukose (physiologische Konzentration) stimuliert.

Bis auf TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führte bereits die alleinige Gabe von Wachstumsfaktoren in vorliegenden Wildtyp-INS-1-Zellen zu vermehrter Proliferation gegenüber der Kontrolle ohne Wachstumsfaktor- und ohne Glukosegabe. Wie in Abb. 14 dargestellt, erkennt man darüber hinaus, dass es, abgesehen von der IL-1 $\beta$ -Gabe zu deutlichen synergistischen Effekten unter gleichzeitiger Gabe von Glukose und Wachstumsfaktoren kommt.



**Abb. 14:**  
**Synergistische Proliferation in INS-1-Zellen**

Wildtyp-INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Wachstumsfaktoren ohne und mit 6 mM Glukose stimuliert. Für die letzten 4h wurde  $[^3\text{H}]$ -markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

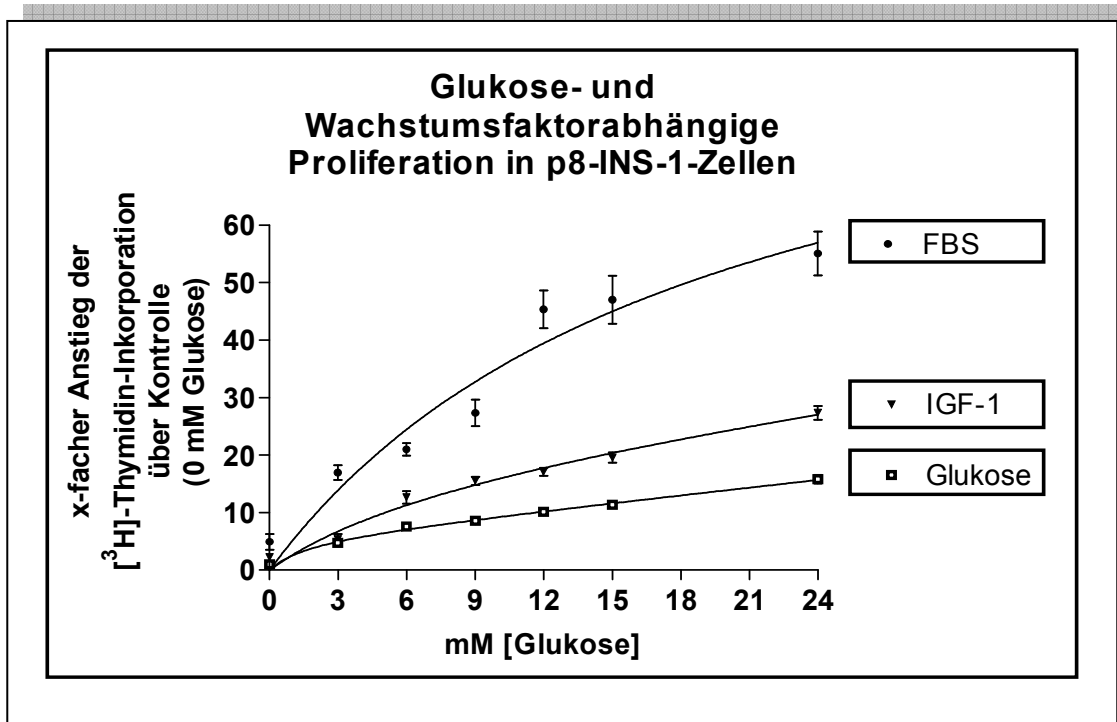
Somit standen nun mehrere Kandidaten an Wachstumsfaktoren zur Untersuchung des Proteins p8 im Umfeld eines proliferationsassoziierten Signaltransduktionsweges zur

Verfügung, wobei FBS in gewisser Weise als ein Schmelztiegel verschiedener Wachstumsfaktoren zu verstehen ist und somit zur Verfolgung dezidiert Signaltransduktionswege auf Proteinebene ungeeignet ist.

Aufgrund des bereits gut untersuchten IGF-1-Signalweges und somit einer größeren Zahl an möglichen Interaktionspartnern für das Protein p8, kristallisierte sich nach verschiedenen Vorversuchen letztlich IGF-1 als vielversprechendster Wachstumsfaktor heraus, um die proliferationsassoziierte Signaltransduktion in der endokrinen beta-Zelle des Pankreas zu untersuchen. Zudem kommt es, wie bei p8, zu einer erhöhten mRNA-Expression von IGF-1 bei einer akuten Pankreatitis [124].

In einem nächsten Schritt konnten die schon durch Hügl et al. [38] gezeigte, glukoseabhängige Proliferation von Wildtyp-INS-1-Zellen unter Wachstumsfaktorzugabe (FBS, IGF-1) nachvollzogen werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden in weiteren Versuchen p8-INS-1-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM, 15 mM, 24 mM) behandelt und es wurde entweder kein Wachstumsfaktor oder FBS bzw. IGF-1 hinzugegeben. Als Kontrolle dienten erneut p8-INS-1-Zellen, die weder mit Glukose noch mit Wachstumsfaktor behandelt wurden. Die Ergebnisse wurden auf diese Kontrolle hin als x-facher Anstieg standardisiert (Abb. 15).



**Abb.15: Glukose- und Wachstumsfaktorabhängige Zellproliferation in p8-überexprimierenden INS-1-Zellen**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen und 10 nM IGF-1 bzw. foetalem Kälberserum (FBS) stimuliert. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

Im niedrigen Glukosebereich bis 6 mM Glukose ergibt sich unter alleiniger Glukosegabe ein Proliferationsanstieg um das 4,7-fache im Vergleich zur Kontrolle, welcher sich bis auf das 15,8-fache bei 24 mM Glukose fortsetzt.

Unter Zugabe von IGF-1 können noch höhere Proliferationsraten erzielt werden, welche ab dem physiologischen Bereich (6mM – 12 mM) augenfällig werden. So werden im subphysiologischen Glukosebereich 5,4-fache, im physiologischen Abschnitt bei 12 mM Glukose 17,1-fache und im supraphysiologischen bei 24 mM Glukose 27,4-fache Anstiege erreicht. Interessanterweise kommt es schon durch alleinige IGF-1-Gabe im glukosefreien Medium zu einem Proliferationsanstieg um das 2,3-fache im Vergleich zur Kontrolle.

Stimuliert man überdies die Zellen mit FBS als Mischung vieler Wachstumsfaktoren, werden Anstiege um das 4,9-fache im glukosefreien Medium bis hin zu 55-fachen

Steigerungen bei 24 mM Glukose verzeichnet, was vermuten lässt, dass es wegen der verstärkten Anstiege unter FBS-Gabe mehrere Interaktionsmöglichkeiten zwischen p8 und verschiedenen Signaltransduktionswegen gibt und eine zentrale Rolle von p8 denkbar erscheint.

Es zeigt sich bereits an dieser Stelle, dass es in p8-INS-1-Zellen glukose- und wachstumsfaktorabhängig zu signifikanten Proliferationssteigerungen kommt.

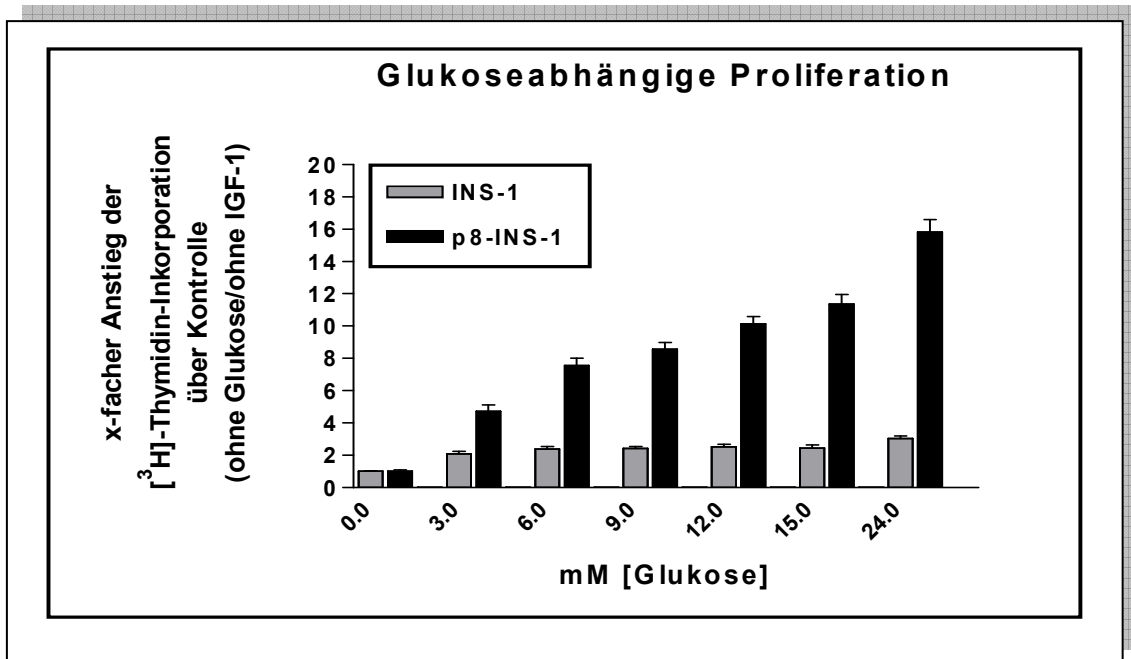
Darüberhinaus lässt sich eine non-lineare Regressionsgerade, und somit eine glukoseabhängige Sättigungskurve, in der Darstellung der einzelnen Ergebnisse nicht signifikant ausschließen (Glukose: p 0,8/ IGF-1: p 0,8/ FBS: p 0,5).

Zur Verdeutlichung der Effekte einer p8-Überexpression sollen im Folgenden die Auswirkungen von Glukose und Wachstumsfaktoren auf die verschiedenen Zelllinien p8-INS-1 und Wildtyp-INS-1 in Relation zueinander betrachtet werden.

### **3.2.2 p8 verstärkt die glukoseabhängige Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas**

Die Auswirkung von Glukose auf das Wachstum von p8-INS-1-Zellen und Wildtyp-INS-1-Zellen wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation untersucht und miteinander verglichen. Mit steigenden Glukosekonzentrationen kommt es in beiden Zelllinien zu progredienter Proliferation, wobei das Wachstum in p8-INS-1-Zellen um ein Vielfaches höher ausfällt (Abb. 16). Im Niedrigglukosebereich bei 3 mM Glukose ergibt sich ein 2,1-facher Anstieg bei Wildtyp-INS-1-Zellen über der Kontrolle im Vergleich zu einem 4,7-fachen Anstieg bei p8-INS-1-Zellen. Im physiologischen Bereich werden bei 6 mM Glukose ein 2,4-facher Anstieg bei Wildtyp-INS-1-Zellen gegenüber einem 7,6-fachen Anstieg bei p8-INS-1-Zellen erreicht. Bei 24 mM Glukose vergleichen sich ein 3-facher Anstieg der Wildtyp-INS-1-Zellen und ein 15,8-facher Anstieg bei den p8-überexprimierenden p8-INS-1-Zellen. Darüberhinaus sind bei beiden Zelllinien vor allem anfänglich starke Proliferationszuwächse zu verzeichnen, die bei zunehmender Glukosekonzentration einem Sättigungseffekt unterliegen, wobei letzterer bei den Wildtyp-INS-1-Zellen stärker ausfällt.

Zusammenfassend besteht ein glukoseabhängiges Wachstum der beta-Zelle des endokrinen Pankreas, welches durch p8-Überexpression deutlich verstärkt werden kann.



**Abb.16: Glukose-abhängige Zellproliferation in p8-überexprimierenden INS-1-beta-Zellen**

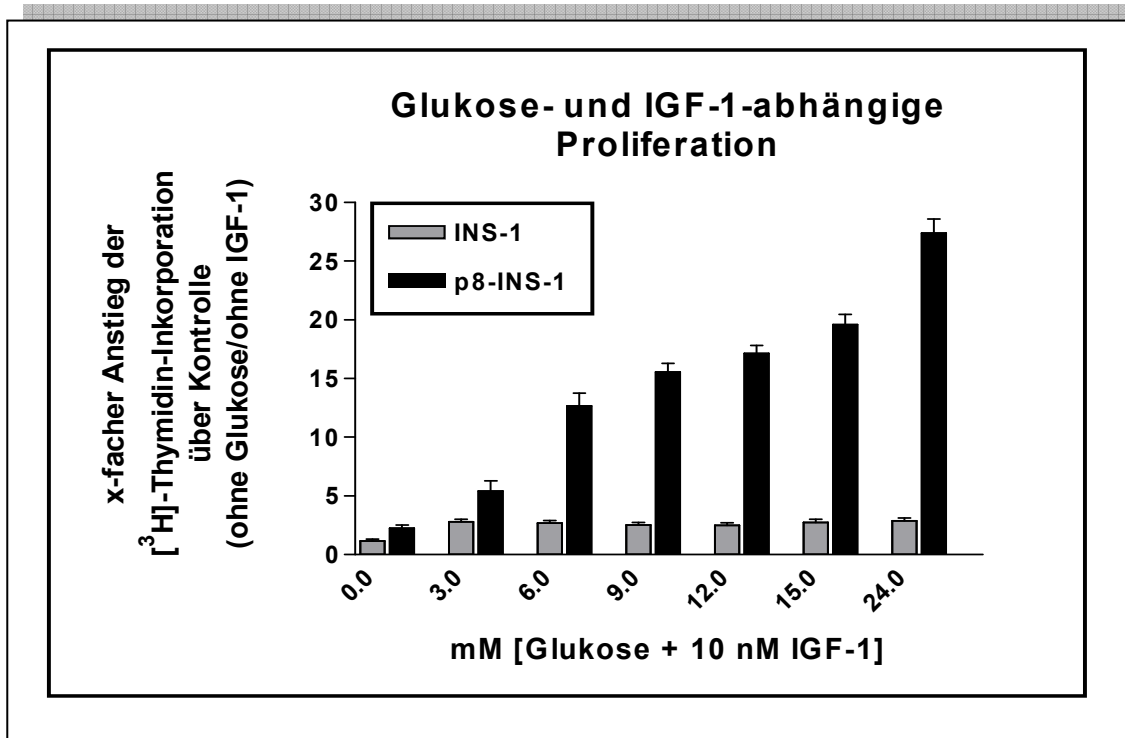
INS-1-Zellen und p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen ohne Wachstumsfaktor-Zugabe stimuliert. Für die letzten 4h wurde  $[^3\text{H}]$ -markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

### 3.2.3 p8 verstärkt die IGF-1-abhängige Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas

Die eben beschriebene glukoseabhängige Proliferationssteigerung durch p8-Überexpression lässt sich durch zusätzliche Stimulation mit IGF-1 steigern. Hierzu wurden Wildtyp-INS-1-Zellen und p8-INS-1-Zellen erneut mittels  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation untersucht. Die Zellen wurden mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (0 mM – 24 mM) unter gleichzeitiger Zugabe von 10 nM IGF-1 für 24 h stimuliert und die Radioaktivität der einzelnen Stimulationsbedingungen mit einem Flüssigszintillationszähler als „counts per minute“ (cpm) bestimmt. Anschließend wurden diese Werte auf die Kontrolle (keine Glukose- oder IGF-1-Gabe) standardisiert.

Dabei erreichen p8-INS-1-Zellen bereits durch die alleinige Zugabe von IGF-1 im glukosefreien Medium einen 2,3-fachen Anstieg im Vergleich zu 1,2-fach bei Wildtyp-INS-1-Zellen. Während sich bei Wildtyp-INS-1-Zellen nach einem 2,7-fachen Anstieg bei 3 mM Glukose bei höheren Glukosekonzentrationen bald ein Sättigungseffekt abzeichnet, weisen p8-INS-1-Zellen im niedrigen Glukosebereich von 3 mM einen 5,4-fachen, bei 6 mM einen 12,7-fachen, bis hin zu einem 19,6-fachen und 27,4-fachen Anstieg bei 15 mM bzw. 24 mM Glukose auf. Es tritt ebenfalls ein Sättigungseffekt auf, der allerdings erst im physiologischen Glukosebereich zwischen 6 mM und 9 mM Glukose in die Plateauphase übergeht.

Zusammenfassend führt p8-Überexpression unter IGF-1-Einfluss zu deutlichen Wachstumssteigerungen der glukoseabhängigen Proliferation. Der Effekt eines Proliferationsanstieges im glukosefreien Medium nur nach Stimulation mit IGF-1 legt die Vermutung nahe, dass p8 als Stressprotein in diesen Signaltransduktionsweg eingebunden ist (Abb. 17).



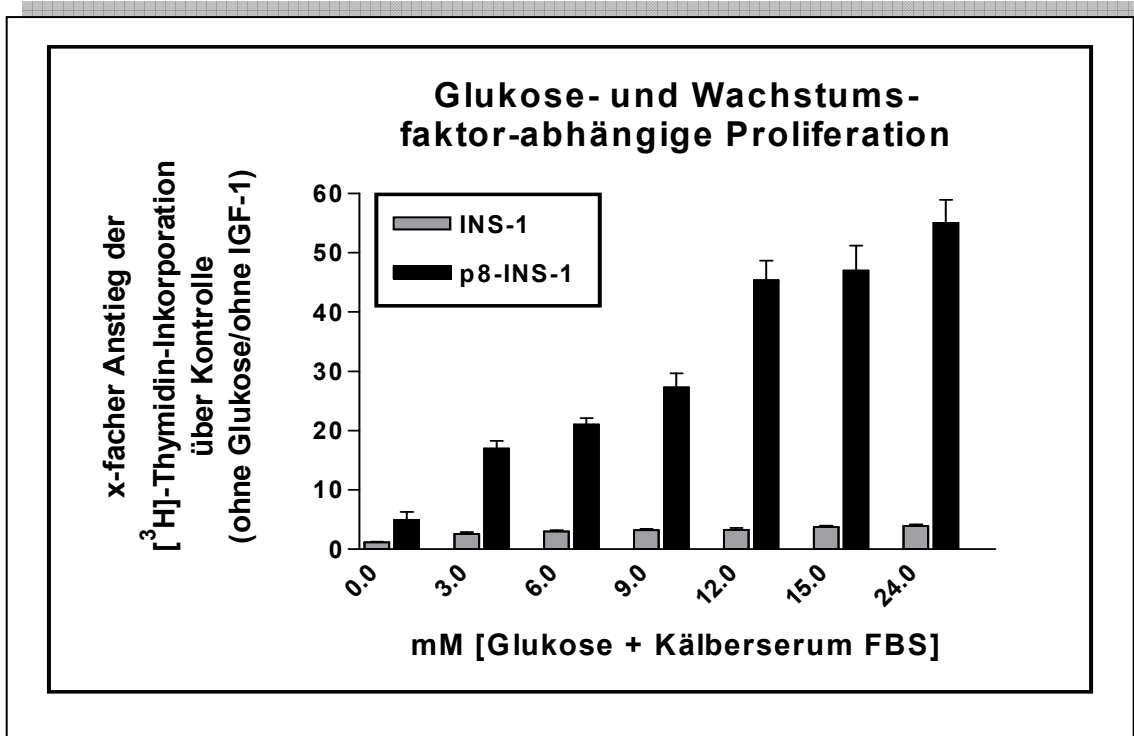
**Abb.17: Glukose- und IGF-1-abhängige Zellproliferation in p8-überexprimierenden INS-1- Zellen**  
 INS-1-Zellen und p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen und 10 nM IGF-1 stimuliert. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

### **3.2.4 p8 verstärkt die Proliferation der beta-Zelle des endokrinen Pankreas unter Zugabe allgemeiner Wachstumsfaktoren**

Nun stellt sich die Frage, ob p8 noch in andere Signalwege involviert sein könnte. Ein Indiz hierfür kristallisierte sich nach Stimulation mit Kälberserum (FBS) heraus:

Wildtyp-INS-1-Zellen und p8-INS-1-Zellen wurden unter den gleichen Glukosebedingungen (0 mM – 24 mM), wie soeben dargestellt, statt mit IGF-1 mit FBS stimuliert. Auch bei dieser Versuchsbedingung bewirkt die alleinige FBS-Gabe im glukosefreien Medium bei p8-INS-1-Zellen einen signifikanten Anstieg der Proliferation, nämlich 4,9-fach im Vergleich zu 1,2-fach bei Wildtyp-INS-1-Zellen. Der Trend verläuft ähnlich wie bei der IGF-1-Stimulation und erreicht letztlich bei 24 mM Glukose einen 55,1-fachen Anstieg der p8-INS-1-Zellen über der Kontrolle gegenüber einem 3,9-fachen Anstieg bei Wildtyp-INS-1-Zellen (Abb. 18).

Da sich in Kälberserum eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren befinden, kommt es, im Vergleich zur Gabe einzelner Wachstumsfaktoren wie IGF-1, zur Aktivierung verschiedener Signalwege in der beta-Zelle des endokrinen Pankreas mit entsprechend verstärkter Proliferation. Durch p8-Überexpression lässt sich dies noch um ein Vielfaches steigern, da p8 mit diversen Signalwegen zu interagieren scheint. Davon abgesehen zeigt sich erneut die Rolle von p8 als Stressprotein, betrachtet man den enormen Proliferationsanstieg im glukosefreien Medium unter alleiniger Gabe von Wachstumsfaktoren (respektive FBS).



**Abb. 18: Glukose- und Wachstumsfaktor-abhängige Zellproliferation in p8-überexprimierenden INS-1-Zellen.** INS-1-Zellen und p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Glukosekonzentrationen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren stimuliert. Für die letzten 4h wurde  $[^3\text{H}]$ -markiertes Thymidin zugegeben. Bestimmung der  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose.

### 3.3 p8 im Umfeld der proliferationsassoziierten Signaltransduktionswege der insulinproduzierenden beta-Zelle des endokrinen Pankreas

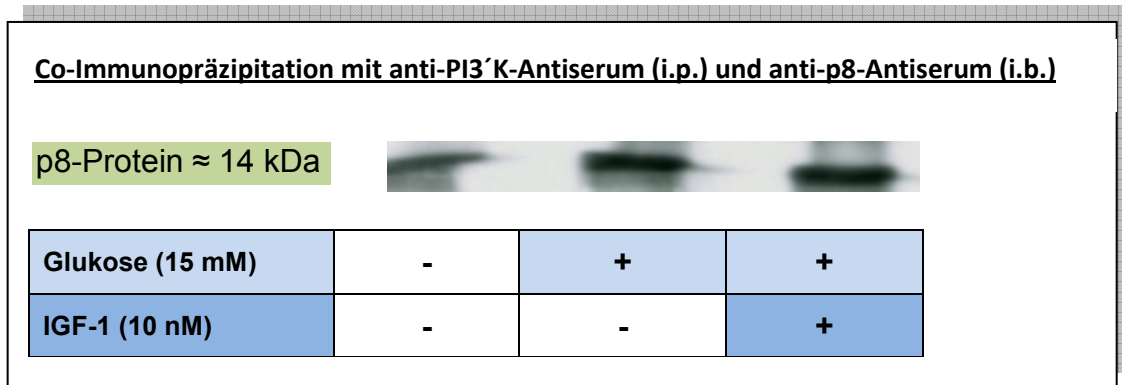
#### 3.3.1 Protein p8 bindet direkt an Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3'K)

Glukose und Wachstumsfaktoren führen zu einer direkten Protein-Protein-Bindung von p8 an PI3'K und aktivieren hierdurch die mitogene Signaltransduktion.

Dieser Umstand konnte durch zwei verschiedene Methoden herausgearbeitet werden. Zum einen wurde mittels Co-Immunopräzipitation (siehe 2.2.7.10) mit einem gegen die 85 kDa große regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3'K p85) gerichteten Antikörper und mittels einer Immunoblotanalyse mit einem gegen p8-Antiserum gerichteten Antikörper die Interaktion von p8 und PI3'K untersucht. Dazu wurden WT-INS-1-Zellen jeweils entweder mit oder ohne 15 mM



Glukose oder zum Teil mit 10 nM IGF-1 stimuliert. Wie in Abb. 19 zu sehen, kommt es zu einer maximalen Bindung von p8 an die regulatorische Untereinheit von PI3'K bei maximaler Stimulation mit 10 nM IGF-1 und 15 mM Glukose.

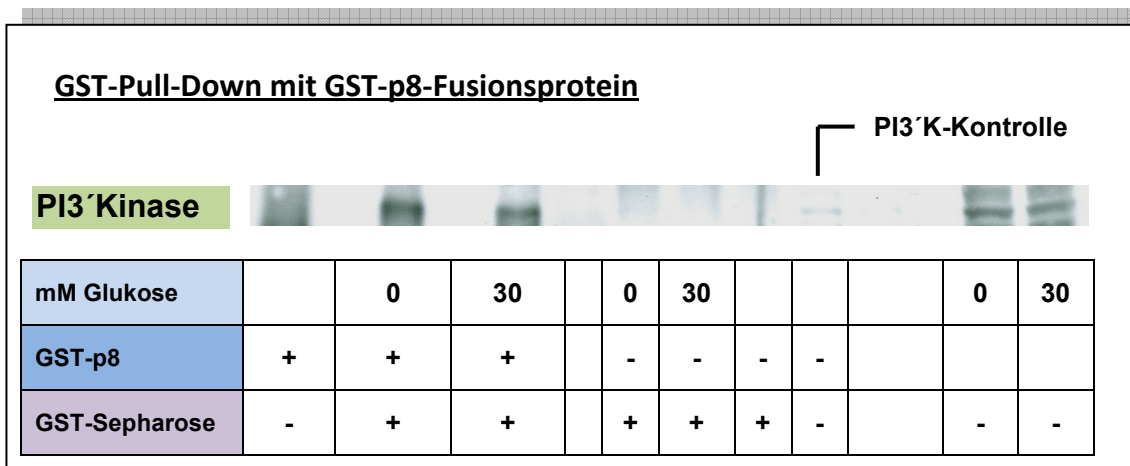


**Abb. 19: Direkte Protein-Protein-Bindung von p8 an PI3'K:**

Zelllysate mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen (0 mM Glukose bzw. 15 mM Glukose mit und ohne Wachstumsfaktor-Zugabe) wurden mit PI3'K-Antiserum inkubiert, anschließend mit Protein-A-Sepharose extrahiert und mittels Western Blot aufgetrennt. Detektion erfolgte mit p8-Antiserum.

Diese Bindung konnte zum anderen mittels eines "GST-Pull-Down" (2.2.7.11) bestätigt werden. WT-INS-1-Zellen wurden entweder mit 30 mM Glukose oder ohne Glukose stimuliert. Die Zellen wurden entsprechend der beschriebenen Methode zu Zelllysaten verarbeitet. Anschließend wurde einem Teil der Lysate ein GST-p8-Fusionsprotein zugegeben und sämtliche Lysate danach bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde wiederum einem Teil dieser Proben ein GST-Antiserum (GST-Sepharose) zur Extraktion zugegeben und letztendlich alle Proben mittels Western Blot nach Molekulargewicht aufgetrennt. Schließlich erfolgte die Detektion der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3'K.

Es zeigt sich, dass sowohl bei 0 mM als auch bei 30 mM Glukose, also in extremen Stressbereichen der Zelle eine Bindung von Protein p8 an die regulatorische Untereinheit der PI3'K nachgewiesen werden kann. Bei den Lysaten, welchen kein GST-p8-Fusionsprotein zugegeben wurde, kann keine PI3'Kinase detektiert werden. Die herkömmlichen Zelllysate weisen, wie zu erwarten, wiederum PI3'Kinase auf (Abb. 20).



**Abb. 20: Direkte Protein-Protein-Bindung von p8 an PI3'K:**

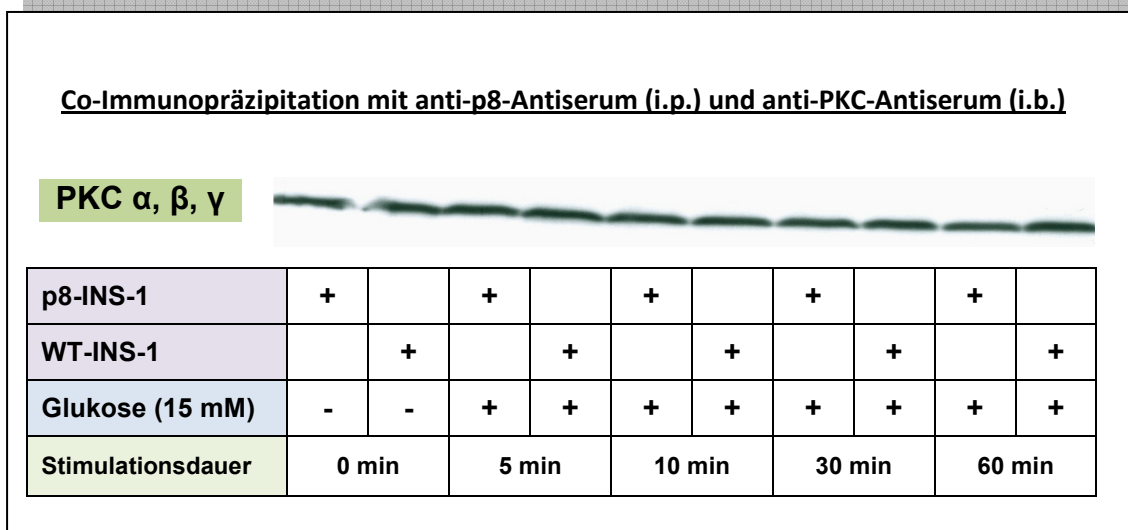
GST-p8-Fusionsprotein wurde mit Zelllysaten inkubiert, anschließend mit GST-Antiserum extrahiert und mittels Western Blot aufgetrennt. Detektion erfolgte mit PI3'K-Antiserum.

### 3.3.2 Protein p8 bindet direkt an Proteinkinase C (PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )

Co-Immunopräzipitation mit anti-p8-Antiserum gefolgt von einer Immunoblotanalyse mit anti-PKC-Antiserum zeigt eine konstitutive Bindung von p8 und PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , welche dosisunabhängig von einer Stimulation mit Glukose ist.

Wildtyp-INS-1-Zellen und p8-INS-1-Zellen wurden mit 15 mM Glukose für 5, 10, 30 bzw. 60 Minuten stimuliert. Nach Inkubation der Lysate mit p8-Antiserum und Extraktion mit Protein-A-Sepharose wurden die Proben mittels Western Blot aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  -Antiserum.

Man erkennt in Abb. 21 die jeweils im direkten Vergleich stehenden beiden Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die vorderen Banden stellen die nicht mit Glukose stimulierte Kontrolle dar. Bemerkenswerterweise findet sich in beiden Zelltypen ein durchgehend gleich starker Bandennachweis, d.h. weder Glukosestimulation noch eine Änderung des Zeitfaktors führen zu Änderungen in der Protein-Protein-Bindung von p8 und PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .



**Abb. 21: Konstitutive direkte Protein-Protein-Bindung von p8 an PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ :**

INS-1-Zellen und p8-überexprimierenden INS-1-Zellen wurden mit 15 mM Glukose für 5, 10, 30 bzw. 60 min stimuliert. Die Lysate wurden mit p8-Antiserum inkubiert, anschließend mit Protein-A-Sepharose extrahiert und mittels Western Blot aufgetrennt. Detektion erfolgte mit PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Antiserum.

In Immunoblotanalysen, respektive Immunopräzipitationen und GST-Pull-Downs mit spezifisch gegen p38 MAPK, PKA, PKC  $\zeta$  oder anderen PKC-Klassen gerichteten Antikörpern ließ sich darüber hinaus keine Protein-Protein-Bindung an p8 nachweisen. Bei Immunopräzipitation mit p38 MAPK gelang zwar der Nachweis von p38MAPK in der nachfolgenden Immunoblotanalyse bei den mit p38 MAPK behandelten Lysaten, quasi als Bestätigung der Methode. Dennoch konnte mit derselben Methode und den gleichen Proben kein p8 dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zu erwähnen bleibt noch, dass bei p8-INS-1-Zellen in Vorversuchen mittels Immunopräzipitation mit anti-PI3'K-Antikörper und Immunoblotanalyse mit anti-IRS-2-Antikörper eine Bindung dargestellt wurde, die vor allem im kurzfristigen Bereich erscheint und über die Zeit hinweg stärker signalisiert (5 min > 10min > 60min bei 15 mM Glukose + IPTG-Gabe, Daten nicht gezeigt).

### 3.4 Effekte inhibitorischer Phosphorylierung auf p8-vermittelte Zellproliferation

Die Effekte spezifischer Proteinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren auf die p8-vermittelte Zellproliferation in p8-INS-1-Zellen wurde mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation untersucht (Tab. 1). In dieser Versuchsreihe wurden p8-überexprimierende p8-INS-1-Zellen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (0 mM – 24 mM Glukose), 10 nM IGF-1 und einem Inhibitor behandelt. Verglichen wurde schließlich das Wachstumsverhalten dieser Zelllinie unter obiger Bedingung ohne und mit p8-Überexpression.

Prozentuale [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporation bei 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1			
INHIBITOR	INHIBIERTES PROTEIN	ohne p8-Überexpression	mit p8-Überexpression
Kontrolle		100,0 ± 4,82	100,0 ± 10,47
Wortmannin (10 nM)	PI3´K	12,5 ± 2,40	18,3 ± 4,01
PKC α,β,γ – Inhibitor (100 µM)	PKC α, β, γ	120,0 ± 9,64	85,3 ± 4,84
PKC ζ - Inhibitor (100 µM)	PKC ζ	109,0 ± 8,00	78,0 ± 4,00
PKA-Inhibitor (10 µM)	PKA, katalyt. Untereinheit	103,0 ± 2,31	75,7 ± 1,33
SB 202190 (10 µM)	p38 MAPK/SAPK2	98,0 ± 8,33	75,3 ± 7,84

Prozentuale [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporation bei 3 mM Glukose + 10 nM IGF-1			
INHIBITOR	INHIBIERTES PROTEIN	ohne p8-Überexpression	mit p8-Überexpression
Kontrolle		100,0 ± 7,36	100,0 ± 10,38
Wortmannin (10 nM)	PI3´K	3,8 ± 0,75	3,5 ± 0,50
PKC α,β,γ – Inhibitor (100 µM)	PKC α, β, γ	96,0 ± 8,08	73,0 ± 3,21
PKC ζ - Inhibitor (100 µM)	PKC ζ	60,0 ± 15,00	54,0 ± 11,00
PKA-Inhibitor (10 µM)	PKA, katalyt. Untereinheit	101,0 ± 4,36	72,0 ± 3,06
SB 202190 (10 µM)	p38 MAPK/SAPK2	93,0 ± 7,57	72,7 ± 3,33

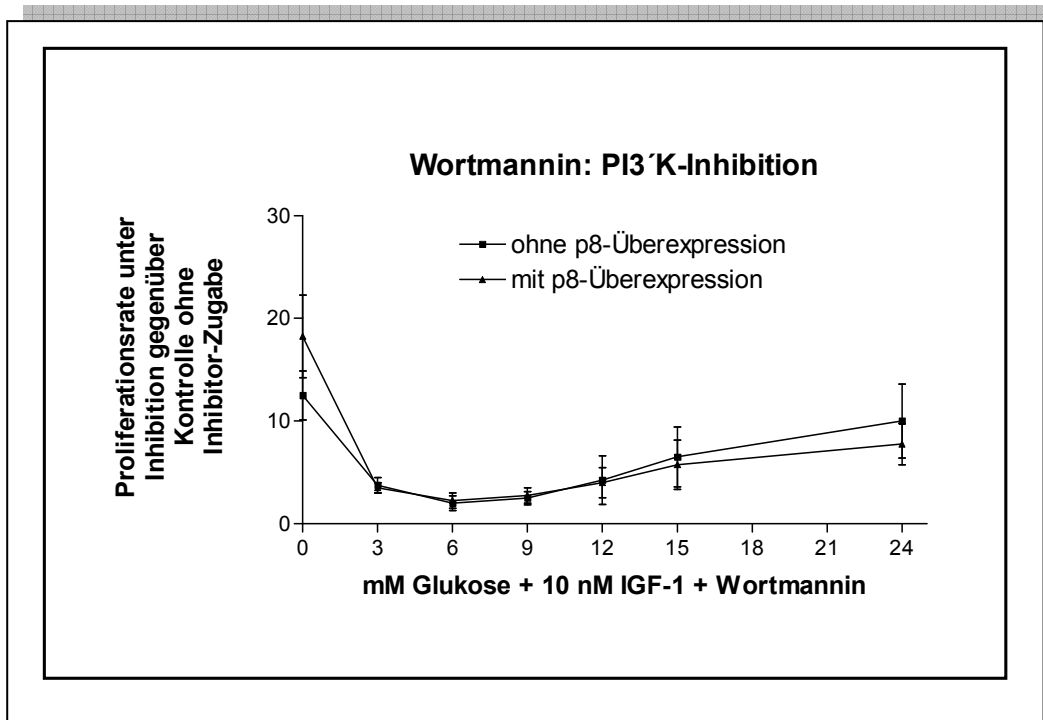
Prozentuale [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporation bei 6 mM Glukose + 10 nM IGF-1			
INHIBITOR	INHIBIERTES PROTEIN	ohne p8-Überexpression	mit p8-Überexpression
Kontrolle		100,0 ± 4,82	100,0 ± 7,45
Wortmannin (10 nM)	PI3´K	2,0 ± 0,71	2,3 ± 0,75
PKC α,β,γ – Inhibitor (100 µM)	PKC α, β, γ	77,3 ± 8,09	68,3 ± 5,89
PKC ζ - Inhibitor (100 µM)	PKC ζ	52,5 ± 8,50	56,0 ± 9,00
PKA-Inhibitor (10 µM)	PKA, katalyt. Untereinheit	84,0 ± 1,73	73,7 ± 2,19
SB 202190 (10 µM)	p38 MAPK/SAPK2	86,3 ± 6,39	62,3 ± 2,91

### **3.4.1 PI3´K-Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation**

Wird die PI3´K-Aktivität durch Gabe von Wortmannin inhibiert, kommt es in p8-überexprimierenden p8-INS-1-Zellen zur signifikanten ( $p < 0,001$ ) und nahezu vollständigen Hemmung der IGF-1-vermittelten Proliferation über alle Glukosebereiche hinweg, wobei die Aktivierung der p8-Überexpression zu einem abgeschwächten Effekt bei alleiniger Stimulation mit IGF-1 ohne weitere Glukosegabe führt (12,5 % Proliferation ohne p8-Überexpression gegenüber 18,3% mit p8-Überexpression). Dies unterstreicht die zentrale Rolle von PI3´K in der mitogenen Signaltransduktion unter Berücksichtigung der proliferativen Effekte von p8 trotz der Inhibition eines zentralen Proteins in der Signalkette. Weitere Bindungspartner von p8, die unabhängig von einer Stimulation von PI3´K zur Proliferation führen, erscheinen somit neben PI3´K wahrscheinlich (Abb. 22).

Interessanterweise wird die Wachstumshemmung im niedrigen bis normalen Glukosebereich noch verstärkt und dies unabhängig davon, ob p8 überexprimiert wird oder nicht. Bei Gabe von 3 mM Glukose, 10 nM IGF-1 und 10 nM Wortmannin beträgt die Thymidin-Inkorporation 3,8 % (ohne p8-Überexpression) gegenüber 3,5 % (mit p8-Überexpression). Wird mit 6 mM Glukose und 10 nM IGF-1 stimuliert bei gleichzeitiger PI3´K-Hemmung, verbleiben lediglich 2,0 % (ohne p8-Überexpression) im Vergleich zu 2,3 % (mit p8-Überexpression). Signifikante Unterschiede zwischen gegebener und fehlender p8-Überexpression ergeben sich dabei nicht.

Auffällig ist eine höhere IGF-1-vermittelte Proliferation im Rahmen der PI3´K-Inhibition bei Gabe von hohen Mengen an Glukose (15 mM – 24 mM Glukose) im Vergleich zur fast vollständigen Hemmung im physiologischen Glukosebereich. Ohne p8-Überexpression werden  $6,5 \pm 2,9$  % (15 mM Glukose + 10 nM IGF-1) und  $10,0 \pm 3,6$  % (24 mM Glukose + IGF-1) erreicht. Mit p8-Überexpression ergeben sich Werte von  $5,8 \pm 2,4$  % (15 mM Glukose + 10 nM IGF-1) und  $7,8 \pm 2,0$  % (24 mM Glukose + IGF-1). Dies könnte ein Hinweis auf zusätzliche proliferationssteigernde Signalwege sein, welche jedoch nicht allein p8-vermittelt zu sein scheinen.

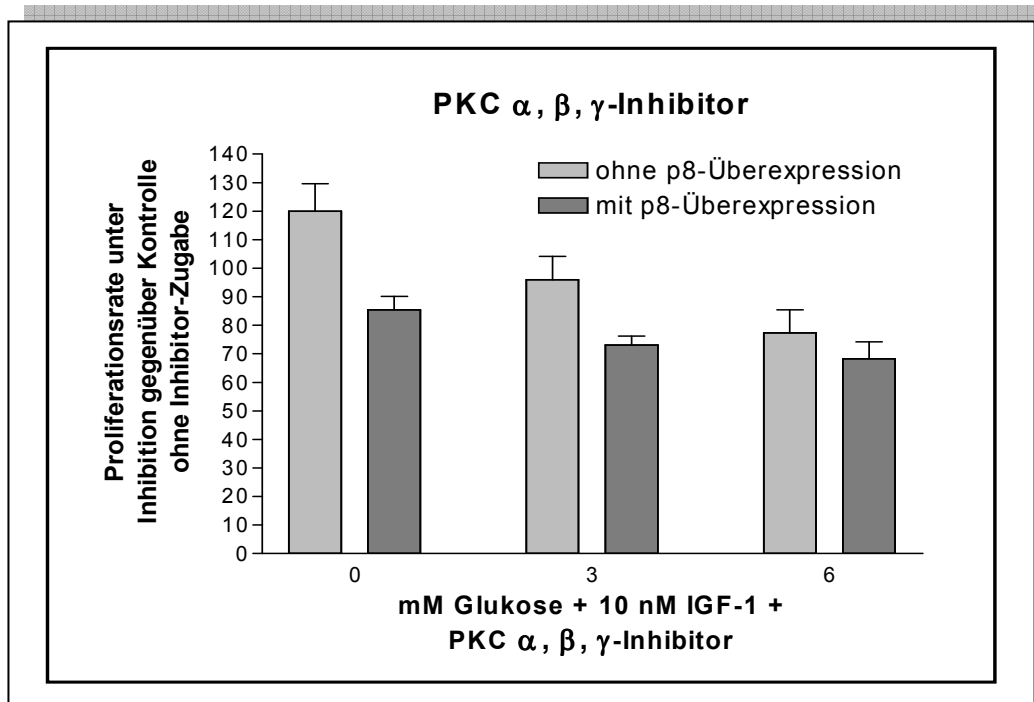


**Abb. 22: PI3'K-Inhibition durch Wortmannin führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation:** p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde Wortmannin zur PI3'K-Inhibition (10 nM) zugegeben und ein Teil der Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression und der andere Teil der Zellen ohne IPTG zur Kontrolle behandelt. Für die letzten 4h wurde  $^3\text{H}$ -markiertes Thymidin zugegeben. Jede Stimulationsbedingung wurde in 6 Replikaten inkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1 als x-facher Anstieg. Dieser Anstieg wurde anschließend mit dem Anstieg unter Inhibitor-Gabe in Relation gesetzt und in Prozent dargestellt.

### 3.4.2 p8 im Umfeld der Proteinkinase-C-Inhibition

Die Inhibition der Proteinkinase C Isoformen PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ergab nur eine mäßige Reduktion der p8-vermittelten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation (Abb. 23). So konnte bei den p8-überexprimierenden p8-INS-1-Zellen nach alleiniger Gabe von IGF-1 und Inhibitor eine Proliferationsrate von  $85,3 \pm 4,84\%$  erreicht werden. Unter zusätzlicher Glukosegabe sinkt die Proliferationsrate auf  $73 \pm 3,21\%$  (3 mM Glukose) und  $68,3 \pm 5,89\%$  (6 mM Glukose). Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass ohne p8-Überexpression bei alleiniger IGF-1-Gabe trotz Inhibitor eine Wachstumssteigerung erreicht wird ( $120 \pm 9,64\%$ ). Mit zusätzlicher Glukose sinken diese Wachstumsraten moderat ( $96,0 \pm 8,08\%$  bei 3 mM Glukose und  $77,3 \pm 8,09\%$  bei 6 mM Glukose).

Insgesamt fällt die Wachstumshemmung bei Inhibition der Proteinkinase C Isoformen PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  im niedrigen und physiologischen Glukosebereich (0 mM – 6 mM Glukose) bei gleichzeitiger p8-Überexpression stärker aus als bei fehlender p8-Überexpression. Im supraphysiologischen Glukosebereich (15 mM – 24 mM Glukose) kommt es weder zu signifikanten Steigerungen noch Reduktionen der Proliferation. Eine Abhängigkeit von der p8-Überexpression ergibt sich hierbei ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23: PKC  $\alpha, \beta, \gamma$ -Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation:**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde ein PKC  $\alpha, \beta, \gamma$ -Inhibitor (100  $\mu$ M) zugegeben und ein Teil der Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression und der andere Teil der Zellen ohne IPTG zur Kontrolle behandelt. Für die letzten 4h wurde [ $^3$ H]-markiertes Thymidin zugegeben. Jede Stimulationsbedingung wurde in 6 Replikaten inkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Bestimmung der [ $^3$ H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1 als x-facher Anstieg. Dieser Anstieg wurde anschließend mit dem Anstieg unter Inhibitor-Gabe in Relation gesetzt und in Prozent dargestellt.

Verwendet man nun einen Inhibitor der Proteinkinase C Isoform  $\zeta$ , zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Isoformen (Abb. 24). Es lässt sich entsprechend der zunehmenden Glukosedosis eine progrediente Proliferationshemmung darstellen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen vorhandener und fehlender p8-

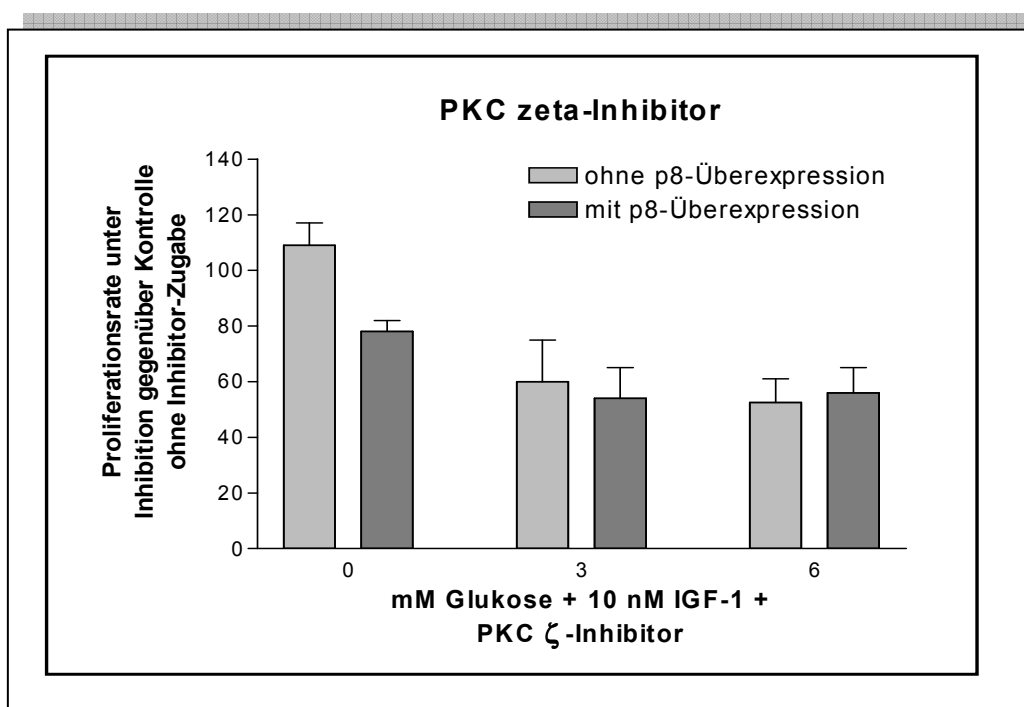
Überexpression auftreten (3 mM – 24 mM Glukose). Einzig bei fehlender Glukosegabe (0 mM Glukose + IGF-1 + Inhibitor) kommt es zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation ( $78,0 \pm 4,00$  % mit p8-Überexpression im Vergleich zu  $109,0 \pm 8,00$  % ohne p8-Überexpression).

Im supraphysiologischen Glukosebereich (15 mM – 24 mM) führt die PKC  $\zeta$ -Inhibition zu einer weiteren Wachstumshemmung, welche unabhängig von der p8-Überexpression ist ( $35,5 \pm 2,50$  % ohne p8-Überexpression im Vergleich zu  $36,0 \pm 0,90$  % mit p8 Überexpression bei Gabe von zusätzlich 15 mM Glukose, sowie  $37,0 \pm 2,00$  % ohne p8-Überexpression im Vergleich zu  $42,0 \pm 2,00$  % mit p8-Überexpression bei Gabe von 24 mM Glukose).

Zum einen ist PKC  $\zeta$  ein wichtiger Partner innerhalb des mitogenen Signaltransduktionsweges in p8-INS-1-Zellen. Zum anderen führt eine PKC  $\zeta$ -Hemmung über die reine IGF-1 stimulierte (und somit glukoseunabhängige) und p8-vermittelte Proliferation zu einer signifikanten Hemmung derselben (vgl. 0 mM Glukose + IGF-1 + Inhibitor).

PKC  $\zeta$  und p8 bilden damit wichtige Interaktionspartner innerhalb des mitogenen Signaltransduktionsweges der beta-Zelle des endokrinen Pankreas.





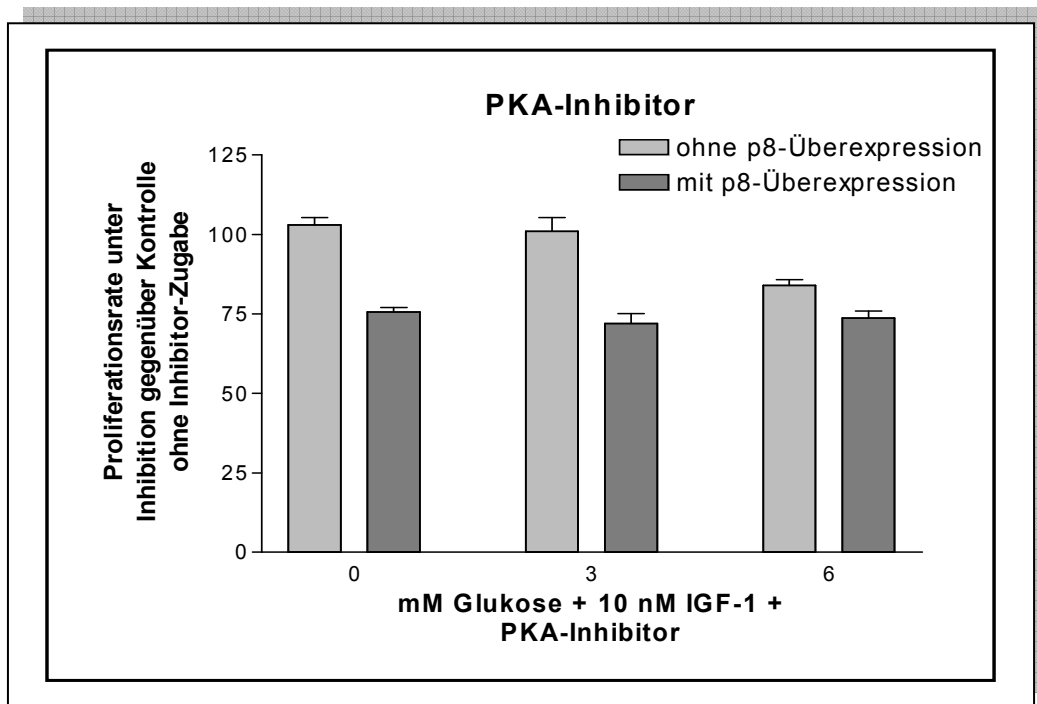
**Abb. 24: PKC ζ-Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation:**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde ein PKC ζ-Inhibitor (100 μM) zugegeben und ein Teil der Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression und der andere Teil der Zellen ohne IPTG zur Kontrolle behandelt. Für die letzten 4h wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin zugegeben. Jede Stimulationsbedingung wurde in 6 Replikaten inkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1 als x-facher Anstieg. Dieser Anstieg wurde anschließend mit dem Anstieg unter Inhibitor-Gabe in Relation gesetzt und in Prozent dargestellt.

### 3.4.3 p8 im Umfeld der Proteinkinase-A-Inhibition

Unter Inhibition der Proteinkinase A kommt es bei fehlender p8-Überexpression erst ab dem physiologischen Glukosebereich zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation (84,0 ± 1,73 % bei 6 mM Glukose + IGF-1 + PKA-Inhibitor). Im niedrigen Glukosebereich (0mM – 3 mM) verharren die Zellen im „steady state“ (103 ± 2,31 % bei 0 mM Glukose i. Vgl. zu 101 ± 4,36 % bei 3 mM Glukose). Erst mit zusätzlicher p8-Überexpression werden die p8-INS-1-Zellen in ihrem Wachstum gehemmt (Abb. 25). Und dies interessanterweise auf einem relativ gleich bleibendem Niveau (75,7 ± 1,33 % bei 0 mM Glukose, 72,0 ± 3,06 % bei 3 mM Glukose und 73,7 ± 2,19 % bei 6 mM Glukose).

Ein Regelkreis zur Feinsteuerung der p8-vermittelten Proliferation scheint hier denkbar. Sollte p8 neben der Zellproliferation auch zu einer Aktivierung von PKA führen, könnte die Inhibition von PKA ihrerseits die p8-vermittelte Proliferation hemmen.



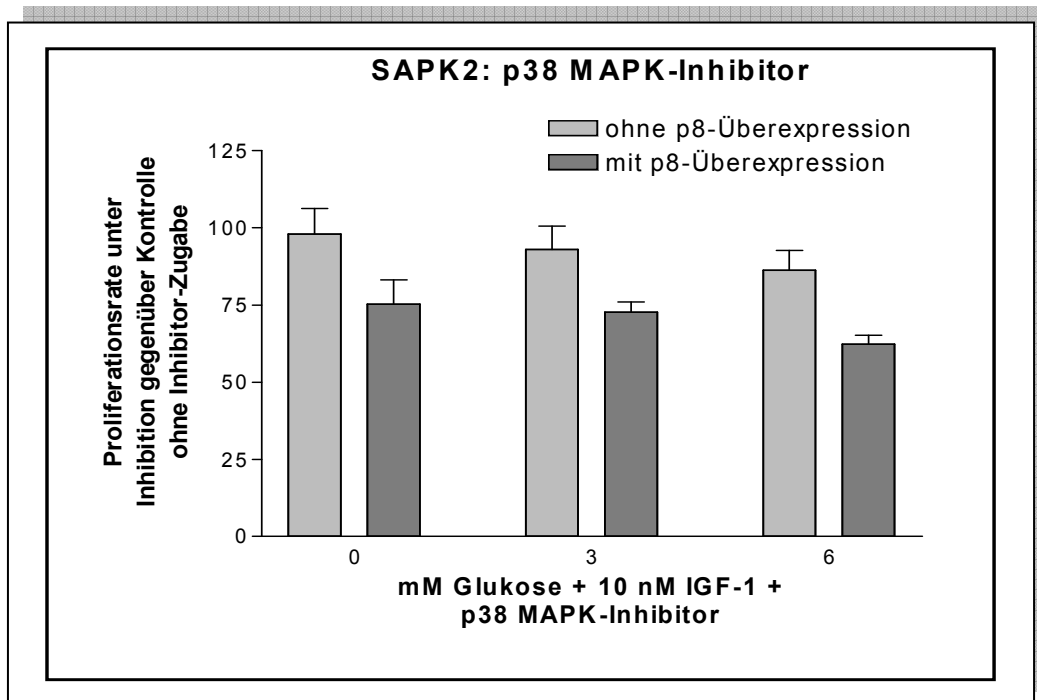
**Abb. 25: PKA-Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation:**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde ein PKA-Inhibitor (10 µM) zugegeben und ein Teil der Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression und der andere Teil der Zellen ohne IPTG zur Kontrolle behandelt. Für die letzten 4h wurde <sup>3</sup>H-markiertes Thymidin zugegeben. Jede Stimulationsbedingung wurde in 6 Replikaten inkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1 als x-facher Anstieg. Dieser Anstieg wurde anschließend mit dem Anstieg unter Inhibitor-Gabe in Relation gesetzt und in Prozent dargestellt.

### 3.4.4 p8 im Umfeld der p38 MAPK-Inhibition

Ein ähnliches Prinzip sieht man bei Inhibition der p38 MAPK (Abb. 26). Ohne p8-Überexpression besteht kaum Wachstumshemmung im subphysiologischen Glukosebereich (98,0 ± 8,33 % bei 0 mM Glukose, 93,0 ± 7,57 % bei 3 mM Glukose). Erst ab dem physiologischen Bereich von 6 mM Glukose werden die p8-INS-1-Zellen leicht gehemmt (86,3 ± 6,39 %). Bei zusätzlicher p8-Überexpression erkennt man

deutliche Proliferationseinbußen im Vergleich zur fehlenden p8-Überexpression  $75,3 \pm 7,84$  % bei 0 mM Glukose,  $72,7 \pm 3,33$  % bei 3 mM Glukose und  $62,3 \pm 2,91$  % bei 6 mM Glukose). Im supraphysiologischen Glukosebereich (15 mM – 24 mM) ist keine klare p8-Abhängigkeit bei gleichzeitig fehlender Proliferationshemmung und auch Proliferationssteigerung abzugrenzen (Daten nicht gezeigt). Somit ist auch hier ein Regelkreis zwischen p8 und p38 MAPK zur Feinsteuerung der p8-vermittelten Zellproliferation bei p8-INS-1-Zellen denkbar.



**Abb. 26: SAPK2/p38 MAPK-Inhibition führt zur Hemmung der p8-vermittelten Proliferation:**

p8-überexprimierende INS-1-Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM - 24 mM) und 10 nM IGF-1 stimuliert. Zusätzlich wurde ein SAPK2/p38 MAPK-Inhibitor (10  $\mu$ M) zugegeben und ein Teil der Zellen mit IPTG zur p8-Überexpression und der andere Teil der Zellen ohne IPTG zur Kontrolle behandelt. Für die letzten 4h wurde [ $^3$ H]-markiertes Thymidin zugegeben. Jede Stimulationsbedingung wurde in 6 Replikaten inkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Bestimmung der [ $^3$ H]-Thymidin-Inkorporation mittels Szintillationszähler als Maß für die Zellproliferation. Standardisierung auf 0 mM Glukose + 10 nM IGF-1 als x-facher Anstieg. Dieser Anstieg wurde anschließend mit dem Anstieg unter Inhibitor-Gabe in Relation gesetzt und in Prozent dargestellt.

### 4 Diskussion

Pathogenetisch kommt es beim Diabetes mellitus Typ I zur immunbedingten Zerstörung der insulinproduzierenden Inselzellen des Pankreas. Um nun diabetische Komplikationen zu vermeiden und auch die Lebensqualität zu verbessern, muss es ein dringendes Anliegen sein, neue Therapiestrategien für den Diabetes mellitus Typ I zu entwickeln oder bestehende Therapien zu optimieren. Die Transplantation von Inselzellen stellt zwar einen möglichen Ansatz dar, muss sich aber einem Mangel an Spenderorganen unterwerfen. Daher bedarf es alternativer Ressourcen für glukosesensitive, glukoseresponsive und insulinproduzierende Zellen, welche weder maligne entarten noch dedifferenzieren [21]. Dies ist die Grundlage der Forschung im Rahmen der Zelltherapie. Als mögliche Kandidaten stehen nicht-humane beta-Zellen, Stammzellen, Progenitorzellen, welche durch spezifische Induktion zu beta-Zellen differenzieren oder auch beta-Zellen, die in vitro zur Proliferation angeregt werden, zur Verfügung [27-29, 139, 140]. Doch bestehen nach wie vor große Schwierigkeiten im Erhalt der spezifischen beta-Zelleigenschaften sowie der Glukosesensitivität [26].

Andererseits bleibt auch bei Transplantation geeigneter Zellen der weiterhin bestehende Autoimmunprozess des jeweiligen Patienten zu bedenken. Nur wenn es gelingt, die transplantierten Zellen vor einer erneuten autoimmunbedingten Zerstörung zu schützen, kann sich aus der Zelltherapie ein geeignetes Verfahren entwickeln.

Davor steht noch ein notwendiger Wissenszuwachs in den Bereichen um Differenzierungsmechanismen, Regeneration und Wachstum der Inselzelle [141]. Sollte schließlich geeignetes Zellmaterial zur Verfügung stehen, muss dieses expandiert werden können, um eine ausreichende Zahl zu generieren. Hierzu müssen molekulare Mediatoren gefunden werden, welche sich positiv auf die Proliferation von beta-Zellen des endokrinen Pankreas auswirken.

### **4.1 p8 als Substrat diverser Wachstumsfaktoren und Stimulatoren**

Das Protein p8 ist dabei als möglicher Mediator für Proliferation in den Focus gerückt. Erstmals im Rahmen einer experimentell induzierten Pankreatitis beschrieben, kristallisierte sich zunehmend seine Bedeutung für die mitogene Aktivität und Proliferation heraus [76, 80, 116]. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die glukoseabhängige und über p8 vermittelte Proliferation von beta-Zellen des endokrinen Pankreas dargestellt [116]. Es zeigte sich eine glukoseabhängige Zunahme der Zellzahl, sowie eine erhöhte p8-mRNA-Expression. In der vorliegenden Arbeit wurden INS-1-Zellen verwendet, die nach stabiler Transfektion eines entsprechenden Plasmids p8 überexprimieren (sog. p8-INS-1-Zellen, siehe 2.2.6). In INS-1-Zellen wurden bereits mehrfach die Auswirkungen von Glukose und verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die mitogene Aktivität untersucht, wobei v.a. Glukose, IGF-1 und GH Proliferation vermitteln, wohingegen durch TGF- $\alpha$  und EGF keine derartigen Impulse zu verzeichnen sind [38, 39, 48]. Vergleicht man nun mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporationsversuchen die Proliferationsraten von INS-1-Zellen und p8-INS-1-Zellen, erkennt man bei beiden Zelllinien ein glukoseabhängiges Wachstum, wobei in p8-überexprimierenden Zellen noch höhere Proliferationssteigerungen erzielt werden können (Abb. 16). Dieser Effekt kann durch zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren, wie eben IGF-1 nochmals gesteigert werden (Abb. 15, 17), sodass von synergistischen Effekten durch gemeinsame Glukose- und IGF-1-Gabe gesprochen werden kann.

In primären embryonalen Fibroblasten konnte nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine erhöhte p8-mRNA-Expression und damit einhergehend die Notwendigkeit dieser p8-Expression für ein optimales Wachstum der verwendeten Fibroblasten nachgewiesen werden. Zudem sei die transkriptionelle Aktivität von Smad durch die p8-Expression erweitert worden [104]. Bei TGF- $\beta$ 1 handelt es sich um sezernierte Zytokine, die von verschiedenen Zelltypen produziert werden und eine große Bandbreite an zellulären Prozessen regulieren, wie beispielsweise Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Produktion der extrazellulären Matrix [142-144]. Dabei ist es abhängig vom Zelltypus und auch mehreren Umgebungsfaktoren, ob es zu positiven oder negativen Einflüssen

auf die Zellteilung oder andere Prozesse kommt [142, 145]. Die durch die Familie der TGF- $\beta$ 1 hervorgerufenen Effekte werden über transmembrane Rezeptoren mit Serin-/Threonin-Aktivität vermittelt. Nach Bindung des Liganden bildet sich ein heteromerer Rezeptorkomplex aus, der aus einem Typ-I- und einem Typ-II-Rezeptor besteht. Innerhalb des Komplexes gibt es eine konstitutiv aktive Kinase des Typ-II-Rezeptors, welche den Typ-I-Rezeptor aktiviert und somit den Smad-Signalweg initiiert. Smad-Proteine zählen zur Familie der Rezeptorsubstrate und stellen überdies Transkriptionsfaktoren dar. Nach Aktivierung des TGF- $\beta$ 1-Typ-I-Rezeptors werden Smad2 und Smad3 phosphoryliert und bilden mit Smad4 einen heteromeren Komplex aus, welcher in den Nucleus transloziert, um die Gentranskription zu regulieren. Die Anreicherung des aktivierten Smad-Komplexes innerhalb des Nucleus führt zu spezifischen DNA-Bindungen und der Bildung eines transkriptionellen Komplexes durch Rekrutierung weiterer DNA-bindender und transkriptioneller Co-Faktoren [104, 146-149].

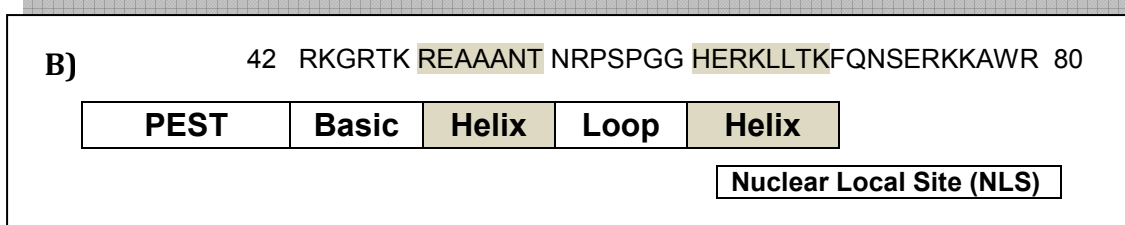
In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Experimente zur möglichen p8-Expression in INS-1-Zellen nach TGF- $\beta$ 1-Gabe durchgeführt, doch konnten hierzu in den ersten Versuchsreihen keine einschlägigen Ergebnisse erzielt werden, weshalb dieser Weg der p8-vermittelten Proliferation durch TGF- $\beta$ 1-Gabe wieder verlassen wurde. Weitergehende Untersuchungen, auch unter Berücksichtigung weiterer Stimulationsfaktoren wie GLP-1, Prolaktin, TNF- $\alpha$  und diverser Interleukine bzw. Zytokine, sind aber durchaus interessant und wichtig für die weitere Einordnung von p8 innerhalb der Zellfunktionen.

### **4.2 p8 als Schlüsselposition in der mitogenen Signaltransduktion der beta-Zelle des endokrinen Pankreas**

Es stellt sich nunmehr die zentrale Frage nach der Einbindung des Proteins p8 in die mitogene Signaltransduktion der beta-Zelle des endokrinen Pankreas. Ein Schlüsselprotein innerhalb der Zellproliferation in INS-1-Zellen stellt die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3'K) dar [38, 48]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine direkte Protein-Proteinbindung zwischen p8 und PI3'K nachgewiesen werden (Abb. 19, 20). Überdies führt die Hemmung der PI3'K in p8-überexprimierenden INS-1-Zellen zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Zellproliferation (Abb. 22). Umso erstaunlicher war es, dass sich p8 auf Proteinebene trotz optimaler Stimulationsbedingungen nicht verstärkt detektieren ließ bzw. mehrfache Banden auftraten (Abb. 7). Nach Gabe von Lactacystin, einem Proteasom-Inhibitor, konnte schließlich eine glukose- und wachstumsfaktorabhängige p8-Expression auf Proteinebene gezeigt werden (Abb. 9, 10).

Das Ubiquitin/Proteasom-System stellt einen selektiven und feinregulierten Prozess zur Lyse zelleigener Proteine, wie z.B. auch dem Protein p8, dar. Gerade viele regulatorische Proteine werden hierdurch in Ihrer Konzentration moduliert. Ubiquitin ist ein ca. 8,5 kDa großes Protein, welches in Form einer Isopeptidbindung mit seinem C-terminalem Glycin kovalent an das Lysin des Substrates bindet. Im Anschluss kann es zur Bildung einer Poly-Ubiquitin-Kette kommen und letztlich wird das betroffene und markierte Protein im 26S-Proteasom abgebaut. Häufige Degradationssignale stellen dabei Phosphorylierungen des Substratproteins oder Dissoziationen von Inhibitoren dar. Man weiß zudem, dass sog. PEST-Sequenzen in der Primärstruktur vieler Polypeptide ein Indiz für einen raschen proteasomalen Abbau sind. PEST-Sequenzen enthalten viele Proline (P), Glutamate (E), Serine (S) und Threonine (T). Dies lässt sich auch in der Primärstruktur von Protein p8 nachweisen (siehe Abb. 27).

<b>A)</b>	gagggcagacatttggaaaaacaggcaagactttggagaaagcagaccaggtatg	ATG GCC	<b>60</b>
		Met Ala	<b>2</b>
	ACC TTG CCA CCA ACA GCC CAC ACT TCC CAG CAA CCT GTA AAC ATA GAG GAC GAA GAT GGG		<b>120</b>
	Thr Leu Pro Pro Thr Ala His Thr Ser Gln Gln Pro Val Asn Ile Glu Asp Glu Asp Gly		<b>22</b>
	ATC CTG GAT GAG TAT GAC CAG TAC AGC CTG GCC CAA TCT TAT GTC GTC GGT GGA GGT CGG		<b>180</b>
	Ile Leu Asp Glu Tyr Asp Gln Tyr Ser Leu Ala Gln Ser Tyr Val Val Gly Gly Gly Arg		<b>42</b>
	AAA GGA CGT ACC AAG AGA GAA GCT GCT GCC AAC ACC AAC CGC CCC AGC CCT GGT GGG CAT		<b>240</b>
	Lys Gly Arg Thr Lys Arg Glu Ala Ala Ala Asn Thr Asn Arg Pro Ser Pro Gly Gly His		<b>62</b>
	GAG AGG AAG CTG CTG ACC AAG TTC CAG AAC TCT GAA AGG AAA AAG GCC TGG CGC TGA gac		<b>300</b>
	Glu Arg Lys Leu Leu Thr Lys Phe Gln Asn Ser Glu Arg Lys Lys Ala Trp Arg End		<b>80</b>
	agagctggagatgagggccagaccagcgacaccacaccagcaatggatacaggaccttggagaattaggagtgtgaag		<b>379</b>
	caggacctaggcctgcttgattctttccacctaagtgaggctctggagaggggaacacccaaaaaaagccctccggacc		<b>458</b>
	cagctaaggggcaagtttaggagcgagaagcagagggtagatgggcagagctaagaaggcaccocccaaaaagaacagtgg		<b>537</b>
	gaaaaactggatgcccttgggtggcagtaacaataaaactgtacaacagtacagcaaaaaaaaaa		<b>602</b>



**Abb. 27: Gensequenz der Ratten-p8-mRNA und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz**  
**A)** Kodierende Anteile in Großbuchstaben mit den zugehörigen Aminosäuren und nicht kodierende Anteile in Kleinbuchstaben dargestellt. Polyadenylierungsstelle unterstrichen.  
**B)** Übersicht der kodierenden Strukturen mit PEST-Sequenz, Helix-Loop-Helix-Motiv und NLS-Code.  
 (aus: „Cloning and Expression of the rat p8 cDNA, a new Gene activated in Pancreas during the Acute Phase of Pancreatitis, Pancreatic Development, and Regeneration, and which promotes cellular growth“, Mallo GV et al., JBC, Vol. 272, No. 51, Issue of December 19, pp. 32360–32369, 1997)

Dies bedeutet, p8 unterliegt einem ständigen und schnellen Abbau im Proteasom über Ubiquitinierung, was sich mit den Analysen anderer Arbeitsgruppen deckt, welche das Proliferationsverhalten von renalen Mesangiumzellen nach Endothelin-Stimulation unter p8-Expression untersuchten [92, 105, 106]. Interessanterweise wird hierbei eine indirekte Beziehung zwischen PI3´K und p8 wie folgt dargestellt: p8 wird durch GSK-3 phosphoryliert, welches seinerseits durch Akt/ PKB gehemmt wird. Akt/PKB wird über PDK1/2 und letztlich PI3´K aktiviert [106]. Dies könnte auch in pankreatischen beta-Zellen einen möglichen Signalweg bilden, was weitere Untersuchungen erfordert. Vor allem stellt sich die Frage, inwiefern eine PI3´K-Aktivierung zu einer potentiellen



proteasomalen Degradation von p8 führt, zumal in der vorliegenden Arbeit verstärkte PI3'K-abhängige p8-Signale gezeigt werden konnten, wenn Glukose und IGF-1 zugegeben werden (Abb. 19).

Doch neben Ubiquitinierung spielt auch die Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Wie oben beschrieben, bietet p8 aufgrund seiner Struktur zahlreiche Phosphorylierungsstellen, was zwar die Detektion erschwert, aber für die Bedeutung und die Funktionsweise des Proteins p8 immanent ist (Abb. 7, 8). Dies scheint ein wichtiger Hinweis für weitere mögliche Interaktionspartner auf Proteinebene zu sein. Dazu zählen unter anderem PKA [90] und PKB [106]. Ebenso sollte in diesem Zusammenhang PKC mit seinen verschiedenen Isoformen erwähnt werden. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Inhibitionsversuche nur indirekte Hinweise hierfür gewonnen werden. Während die Hemmung der PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  zu einer eher mäßigen Proliferationshemmung der p8-vermittelten Proliferation führte (Abb. 23, Tab. 1), kam es nach Inhibition von PKC  $\zeta$  zu einer signifikanten glukoseunabhängigen Hemmung der Proliferation nach reiner IGF-1-Gabe (Abb. 24, Tab. 1). Die Bindung von PKC  $\zeta$  und p8 konnte auf Proteinebene leider nicht dargestellt werden. Nichtsdestotrotz gelang der Nachweis einer direkten Protein-Protein-Bindung zwischen PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und p8 (Abb. 21).

Der eindeutige Nachweis einer Bindung zwischen Protein p8 und diversen Proteinkinasen muss also noch geführt werden. Interessant ist dabei auch die Fragestellung um die jeweilige Funktion dieser möglichen Bindungspartner. Wirken sie hemmend, aktivierend, bilden sie lediglich Substrate oder rufen sie sogar morphologische Veränderungen hervor? Wichtig erscheint auch, die Inhibition der Proliferation in INS-1-Zellen durch Blockade der p8-Expression mittels spezifischer siRNA-Untersuchungen hervorzurufen, da eine vollständige Proteasomhemmung durch Lactacystin die Grundvoraussetzungen für Analysen der Zellproliferation zu stark verfälschen dürfte.

Zudem sei erwähnt, dass p8 ein weiteres großes Feld für Analysen in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor bietet, wie es bereits mehrfach beschrieben wurde [76, 79, 84, 87-90, 92, 117, 118].

### **4.3 Die Rolle des Proteins p8 bei Tumorwachstum**

In der Literatur wurde das Protein p8 (oder auch Com1 bzw. NUPR1) immer wieder in Zusammenhang mit Tumorwachstum untersucht bzw. auch beschrieben [84, 150]. Bisher erfolgte der Nachweis von Tumorprogression und Metastasierung bzw. Wachstumshemmung in verschiedensten Zellen, die jedoch nicht dem Modell einer normalen beta-Zelle entsprechen. Beispielhaft sei angeführt, dass Malicet et al. in den Zelllinien Panc-1 und BxPc-3 eine Wachstumshemmung bei erhöhter p8-Expression zeigten. Bemerkenswerterweise handelt es sich bei Panc-1 und BxPc-3 um pankreatische Krebszellen mit Mutationen von K-ras und Smad4/DPC4. Diese Mutationen gelten als führende Mechanismen in der Entwicklung eines Pankreascarcinoms [91, 151, 152]. In eben diesen Zellen wurde eine Deregulierung der p8-Expression unter FBS-Gabe, aber auch unter Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges nachgewiesen [91]. Überdies führte die Aktivierung des JNK-Signalweges ebenfalls zu einer verminderten p8-Expression in pankreatischen Krebszellen. Die c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal-Kinase (JNK) ist ein Teil des MAPK-Signalweges und wandelt extrazelluläre Signale in die Expression spezifischer Zielgene mittels Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren um. Dabei tritt die Aktivierung von JNK bei verschiedenen und teilweise konträren zellulären Signalantworten wie Proliferation, Transformation und Apoptose auf [91]. Im Gegenzug führen eine Inhibition des p38 MAPK-Signalweges und die Gabe von TGF- $\beta$ 1 zu einer Verminderung der p8-Expression, sind also Induktoren des p8-Signalweges in pankreatischen Krebszellen [91]. Die Signaltransduktion über p38 MAPK spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung von Zellwachstum, Inflammationsantwort, Differenzierung und Apoptose. Es kann über Smad, also letztlich durch TGF- $\beta$ 1-Stimulation aktiviert werden. Gerade in pankreatischen Krebszellen bildet p38 MAPK einen starken Gegenpol zum Ras-Raf-MEK-ERK- und JNK-Signalweg, indem es die Proliferation hemmt [91, 153].

Im Rahmen dieser Arbeit führte die Gabe von TGF- $\beta$ 1 zu einer Proliferation der INS-1-Zellen (Abb. 14). Eine direkte Protein-Protein-Bindung zwischen p8 und p38 MAPK gelang in ersten Versuchen nicht. Allerdings konnte mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation gezeigt werden, dass durch Inhibition von p38 MAPK eine mäßige

Proliferationshemmung der p8-INS-1-Zellen im niedrigen bis normalen Bereich der Glukosestimulation unter gleichzeitiger p8-Überexpression erzielt wird (Abb. 26). Diese Abhängigkeit von p8 und p38 MAPK korreliert also gut mit den Ergebnissen von Malicet et al., wobei in INS-1-Zellen eine p8-vermittelte Zellproliferation sowohl nach Glukose- als auch nach IGF-1-Stimulation nachgewiesen werden konnte (Abb. 15-18). Die Einbindung in den MAPK- JNK- und auch TGF- $\beta$ 1-vermittelten Signalweg bedarf noch eingehender Studien, wobei bereits in INS-1-Zellen gesehen wurde, dass ERK-1/2 kein zentrales Protein der Signaltransduktion bezüglich glukose- und wachstumsfaktorabhängiger Zellproliferation darstellt [38, 39, 48, 154].

Überdies sei noch bemerkt, dass innerhalb der oben beschriebenen pankreatischen Krebszellen p8 herab reguliert wird, sollten onkogene Signalwege angeschaltet werden. p8 also in Zusammenhang mit unkontrollierter Proliferation der beta-Zelle zu sehen, erscheint daher fraglich. Was bedeutet dies nun für die Rolle von p8? Zum einen scheint p8 die Proliferation bei Zellstress zu fördern und fungiert somit als Stressprotein. Zum anderen gibt es Mechanismen und Regelkreise, die bei einer erhöhten p8-Protein-Expression, wie sie durch Glukose und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird (Abb. 9), eingreifen. Phosphorylierungen und proteasomaler Abbau sind Ausprägungen dieser Regelkreise, Verfeinerungen werden durch Interaktionen mit anderen Proteinen (p38 MAPK, PKA, PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , PKC  $\zeta$ ) vermittelt (Abb. 9, 10, 23-26).

Nach Meinung des Autors handelt es sich daher bei p8 per se nicht um ein tumorinduzierendes Protein, sondern es stellt im Rahmen des Tumorwachstums ein Epiphänomen dar. Da die Zelle das Protein p8 zur Proliferation benötigt, sei diese nun maligner oder benigner Natur, erscheint es nur zwingend, dass erhöhte p8-Expressionen in metastasierenden Zellen gemessen werden [93] und dass p8 ein kritisches Moment für die durch Onkogene induzierte Tumorprogression darstellt [100]. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass p8 direkt an der Entdifferenzierung einer Zelle beteiligt ist und eine p8-Überexpression zu unkontrolliertem Wachstum führt. Im Gegenteil zeigen viele Studien, dass eine Hemmung der p8-Expression eine Hemmung der Zellproliferation nach sich zieht [91, 95, 97, 98], was im Umkehrschluss

als tumorinduzierende Rolle von p8 gedeutet wurde. Vielmehr scheint p8 durch seine Rolle als Stressprotein einen protektiven Charakter zu besitzen [76, 78, 102, 103, 108]. Indizien hierfür konnten in der vorliegenden Arbeit mehrfach dargelegt werden, indem es beispielsweise bei extremen Bedingungen wie Mangel- aber auch Hypernutrition zu vermehrter p8-Expression bzw. p8-vermittelter Proliferation kommt (Abb. 10-13, 17, 18, 20).

Weitere differenzierte Studien, die die Auswirkungen verschiedener Stimulationsfaktoren (Interleukine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, etc.) auf p8 und auch die Einbindung von p8 in diverse Regelkreise der Signaltransduktion (onkogen, apoptotisch, anti-apoptotisch, proliferativ, differenzierend, etc.) charakterisieren, sind also notwendig.

### 5 Zusammenfassung

Ein möglicher Ansatz neuer Therapiestrategien für Diabetes mellitus besteht zum einen in der Differenzierung von Stammzellen zu insulinproduzierenden Zellen und zum anderen in der Beschleunigung der Zellproliferation ebensolcher Zellen.

In zahlreichen Studien wurden bereits mitogene Signaltransduktionswege in beta-Zellen des endokrinen Pankreas unter dem Einfluss diverser Nährstoffe untersucht.

Das Protein p8, ursprünglich im Umfeld einer experimentell induzierten akuten Pankreatitis im Rattenmodell als Stressantwort beschrieben [76], ist an einem glukoseabhängigen Zellwachstum in der insulinproduzierenden beta-Zelle des endokrinen Pankreas beteiligt [116].

Insofern ist es nur schlüssig, die Rolle des Proteins p8 im Rahmen der proliferationsassoziierten Signaltransduktion zu untersuchen.

Zur näheren Charakterisierung von p8 wurden von unserer Arbeitsgruppe Wildtyp-INS-1-Zellen (WT-INS-1), als Modell für die beta-Zelle des endokrinen Pankreas, mit einem durch IPTG induzierbaren, p8-exprimierenden System ausgestattet (siehe auch 2.2.6). Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst auf seine Funktionalität hin überprüft. Hierzu gelang der Nachweis des p8-überexprimierenden Plasmids p8pOPRSVI und des LAC-Repressors in p8-INS-1-Zellen (Abb. 3, 4). Zudem konnte p8-cDNA in den stabil transfizierten p8-INS-1-Zellen und in den mit obigem Plasmid transient transfizierten WT-INS-1-Zellen dargestellt werden, wobei die transient transfizierten WT-INS-1-Zellen stärker signalisierten (Abb. 5) und somit ein höheres „output“ an p8 zu generieren scheinen.

In Immunoblotanalysen ergab sich ein ähnliches Bild. Durch p8-Überexpression kommt es zu einem zunehmenden Signal des Proteins p8 innerhalb der p8-INS-1-Zellen. Jedoch erscheint dieses Signal in WT-INS-1-Zellen noch stärker (Abb. 6). Ebenso ließen sich mehrfach Doppelbanden sowohl bei p8-INS-1-Zellen als auch bei WT-INS-1-Zellen bei 14 kDa und 22 kDa darstellen (Abb. 7). Das differenzierte Expressionsmuster beider Zelllinien im Rahmen dieser Immunoblotanalysen legt den Schluss nahe, dass eine Erhöhung des p8-Levels, sei es nun durch Induktion per IPTG-Gabe oder durch Wachstumsfaktoren, zu einem veränderten Molekulargewicht des Proteins p8 führt.

Das Protein p8 unterliegt somit ständigen Veränderungen im Rahmen der Protein-Protein-Interaktion. Im Vordergrund stehen dabei Phosphorylierungen als Aktivierungsinitiatoren (Abb. 7, 8) und Ubiquitinierung mit synergistischer Proliferationszunahme unter p8-Überexpression und gleichzeitiger Proteasomhemmung (Abb. 9, 10). Gerade in Phasen erhöhten Zellstress (Hypo- und Hypernutrition) lassen sich durch p8-Überexpression erhöhte Wachstumsraten nachweisen, während im physiologischen Bereich nur bei gleichzeitiger Proteasomhemmung Wachstumssteigerungen durch p8-Überexpression erreicht werden können (Abb. 11-13). Dies unterstreicht einmal mehr die Rolle von p8 als Stressprotein.

Nichtsdestotrotz übertreffen die Proliferationsraten der p8-INS-1-Zellen die der WT-INS-1-Zellen unter den verschiedensten Stimulationsbedingungen bei weitem. So konnte gezeigt werden, dass in den p8-INS-1-Zellen eine progrediente, glukoseabhängige Proliferation vorliegt, welche sich durch Gabe von IGF-1 oder foetalem Kälberserum (FBS) zu einem signifikanten synergistischen Wachstum ausweiten lässt (Abb. 15). Und auch hier erzeugt p8 als Stressprotein bei p8-INS-1-Zellen im glukosefreiem Medium bei alleiniger Stimulation mit Wachstumsfaktoren signifikante Wachstumsraten im Vergleich zu WT-INS-1-Zellen (Abb. 16-18).

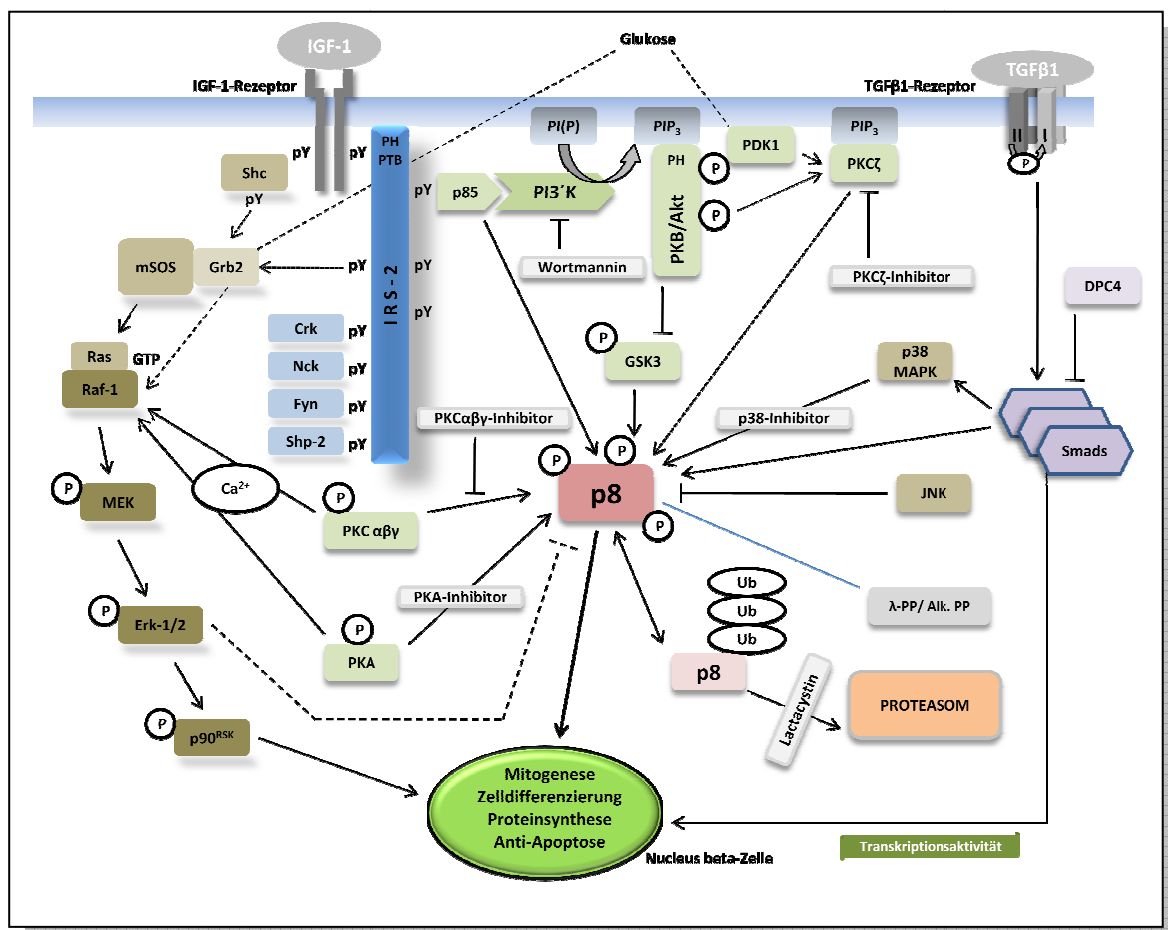
Die Umsetzung der Stimulation durch Glukose und Wachstumsfaktoren auf die p8-vermittelte Proliferation vollzieht sich konsekutiv innerhalb der Signaltransduktion. Mit Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3'K) als Schlüsselprotein innerhalb der mitogenen Signaltransduktion und Proteinkinase C (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) konnten durch Co-Immunopräzipitationen, GST-Pull-Downs, Immunoblotanalysen aber auch Inhibitionsversuche (Tab. 1) wichtige Interaktionspartner von p8 identifiziert werden (Abb. 19- 23).

Weitere Bindungspartner des Proteins p8 resultierten durch Inhibitionsversuche (Tab. 1) mit Proteinkinasen wie PKC  $\zeta$  (Abb. 24) und PKA (Abb. 25), aber auch p38 MAPK als Vertreter des MAPK-Signalweges (Abb. 26). Dabei zeigt sich ein relativ gleiches Bild mit einer tendenziell eher mäßigen Proliferationshemmung im niedrigen bis normalen Glukosebereich, welche sich unter p8-Überexpression verstärkt. Verschiedene Regelkreise zur Feinsteuerung der p8-vermittelten Proliferation scheinen

hier denkbar. Sollte p8 neben der Zellproliferation auch zu einer Aktivierung der genannten Proteine führen, könnte die Inhibition dieser Proteine ihrerseits die p8-vermittelte Proliferation hemmen (Abb.28).

Auf Proteinebene ließ sich die Verbindung zwischen p8 und MAPK p38, PKC ζ, PKA und PKB in der vorliegenden Arbeit leider nicht nachweisen, erscheint aber aufgrund der Primärstrukturen der Proteine, sowie Erkenntnissen aus der bisherigen Literatur und auch aufgrund der Versuche mit Proteininhibitoren im Rahmen dieser Arbeit wahrscheinlich. Weitergehende Untersuchungen sollten diesbezüglich noch erfolgen.

Die vorgestellten Ergebnisse sind ein Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle des Proteins p8 innerhalb der mitogenen Signaltransduktion als eine Voraussetzung für einen kurativen Ansatz des Diabetes mellitus Typ I.



**Abb. 28: p8 als Schlüsselprotein in der mitogenen Signaltransduktion der beta- Zelle des endokrinen Pankreas**

## 6 Literaturverzeichnis

1. Lingohr, M.K., R. Buettner, and C.J. Rhodes, *Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes?* Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 375-84.
2. Nielsen, J.H., et al., *Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors.* Diabetes, 2001. **50 Suppl 1**: p. S25-9.
3. Argetsinger, L.S. and C. Carter-Su, *Mechanism of signaling by growth hormone receptor.* Physiol Rev, 1996. **76**(4): p. 1089-107.
4. *Supplement 1. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2000.* Diabetes Care, 2000. **23 Suppl 1**: p. S1-116.
5. Atkinson, M.A. and N.K. Maclaren, *The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.* N Engl J Med, 1994. **331**(21): p. 1428-36.
6. Hugl, S.R. and K.D. Palitzsch, *[What is new about diabetes mellitus, type 2?].* Krankentpfl J, 1999. **37**(6): p. 223-5.
7. Rosenbauer, J., A. Icks, and G. Giani, *Incidence and prevalence of childhood type 1 diabetes mellitus in Germany--model-based national estimates.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2002. **15**(9): p. 1497-504.
8. Barbosa, J., *The search for genetic markers of diabetes.* Diabetes Care, 1979. **2**(4): p. 388-9.
9. Owerbach, D. and K.H. Gabbay, *The search for IDDM susceptibility genes: the next generation.* Diabetes, 1996. **45**(5): p. 544-51.
10. Honeyman, M.C., et al., *Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes.* Diabetes, 2000. **49**(8): p. 1319-24.
11. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.* Lancet, 2001. **358**(9277): p. 221-9.
12. Leslie, R.D., M.A. Atkinson, and A.L. Notkins, *Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes.* Diabetologia, 1999. **42**(1): p. 3-14.
13. Peakman, M., et al., *Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1749-54.
14. Lan, M.S., et al., *IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6367-70.
15. Lu, J., et al., *Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2307-11.
16. Scott, C.R., et al., *Characteristics of youth-onset noninsulin-dependent diabetes mellitus and insulin-dependent diabetes mellitus at diagnosis.* Pediatrics, 1997. **100**(1): p. 84-91.



17. Koschinsky, T., et al., *Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6474-9.
18. *Implications of the Diabetes Control and Complications Trial*. American Diabetes Association. Diabetes Care, 1993. **16**(11): p. 1517-20.
19. Alejandro, R., et al., *Islet cell transplantation in type I diabetes mellitus*. Transplant Proc, 1987. **19**(1 Pt 3): p. 2359-61.
20. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
21. Schrezenmeir, J. and C. Laue, [*Current aspects of islet cell transplantation*]. Med Klin, 1996. **91 Suppl 1**: p. 19-24.
22. Tacke, S.J., R. Kurth, and J. Denner, *Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?* Virology, 2000. **268**(1): p. 87-93.
23. Krickhahn, M., et al., *Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function*. Ann Transplant, 2001. **6**(3): p. 48-54.
24. Meyer, T., B. Hocht, and K. Ulrichs, *Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression*. Pediatr Surg Int, 2008. **24**(12): p. 1375-8.
25. Falqui, L., et al., *Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(11): p. 1753-62.
26. Beattie, G.M., et al., *Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 1013-9.
27. Montana, E., S. Bonner-Weir, and G.C. Weir, *Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. Changes in beta cell replication and mass*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1577-82.
28. Montana, E., S. Bonner-Weir, and G.C. Weir, *Transplanted beta-cell replication and mass increase after 95% pancreatectomy*. Transplant Proc, 1994. **26**(2): p. 657.
29. Zulewski, H., *Stem cells with potential to generate insulin producing cells in man*. Swiss Med Wkly, 2006. **136**(41-42): p. 647-54.
30. Bonner-Weir, S. and F.E. Smith, *Islet cell growth and the growth factors involved*. Trends Endocrinol Metab, 1994. **5**(2): p. 60-4.
31. Smith, F.E., et al., *Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6152-6.
32. Swenne, I., *Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus*. Diabetologia, 1992. **35**(3): p. 193-201.
33. Swenne, I. and A. Andersson, *Effect of genetic background on the capacity for islet cell replication in mice*. Diabetologia, 1984. **27**(4): p. 464-7.
34. Sjöholm, A., *Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms*. Diabetes, 1997. **46**(7): p. 1141-7.

35. Rhodes, C.J., et al., *Effects of glucose and D-3-hydroxybutyrate on human pancreatic islet cell function*. Clin Sci (Lond), 1985. **68**(5): p. 567-72.
36. Brelje, T.C. and R.L. Sorenson, *Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy*. Endocrinology, 1991. **128**(1): p. 45-57.
37. Nielsen, J.H., et al., *Growth hormone is a growth factor for the differentiated pancreatic beta-cell*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(1): p. 165-73.
38. Hugl, S.R., M.F. White, and C.J. Rhodes, *Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17771-9.
39. Cousin, S.P., et al., *Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling*. Biochem J, 1999. **344 Pt 3**: p. 649-58.
40. Prentki, M., *New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion*. Eur J Endocrinol, 1996. **134**(3): p. 272-86.
41. Prentki, M. and F.M. Matschinsky, *Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion*. Physiol Rev, 1987. **67**(4): p. 1185-248.
42. Prentki, M., K. Tornheim, and B.E. Corkey, *Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion*. Diabetologia, 1997. **40 Suppl 2**: p. S32-41.
43. Rhodes, C.J., *IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication*. J Mol Endocrinol, 2000. **24**(3): p. 303-11.
44. Khoo, S. and M.H. Cobb, *Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5599-604.
45. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
46. Dickson, L.M., et al., *Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1)*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21110-20.
47. Dennis, P.B., et al., *Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1102-5.
48. Lingohr, M.K., et al., *Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 966-76.
49. Argetsinger, L.S. and C. Carter-Su, *Growth hormone signalling mechanisms: involvement of the tyrosine kinase JAK2*. Horm Res, 1996. **45 Suppl 1**: p. 22-4.
50. Benito, M., A.M. Valverde, and M. Lorenzo, *IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells*. Int J Biochem Cell Biol, 1996. **28**(5): p. 499-510.

51. White, M.F. and L. Yenush, *The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998. **228**: p. 179-208.
52. Rhodes, C.J. and M.F. White, *Molecular insights into insulin action and secretion*. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32 Suppl 3**: p. 3-13.
53. Hawkins, P.T., et al., *Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 5): p. 647-62.
54. Downward, J., *Lipid-regulated kinases: some common themes at last*. *Science*, 1998. **279**(5351): p. 673-4.
55. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
56. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. *EMBO J*, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
57. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. *Curr Biol*, 1997. **7**(4): p. 261-9.
58. Stokoe, D., et al., *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*. *Science*, 1997. **277**(5325): p. 567-70.
59. Feng, J., et al., *Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(39): p. 41189-96.
60. Nave, B.T., et al., *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. *Biochem J*, 1999. **344 Pt 2**: p. 427-31.
61. Scott, P.H., et al., *Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(13): p. 7772-7.
62. Woodgett, J.R., *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*. *EMBO J*, 1990. **9**(8): p. 2431-8.
63. Woodgett, J.R., *cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3*. *Methods Enzymol*, 1991. **200**: p. 564-77.
64. Mussmann, R., et al., *Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 12030-7.
65. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
66. Patel, S., B. Doble, and J.R. Woodgett, *Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword?* *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 5): p. 803-8.
67. Cohen, P. and M. Goedert, *GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(6): p. 479-87.
68. Meijer, L., M. Flajolet, and P. Greengard, *Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(9): p. 471-80.
69. Fatrai, S., et al., *Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): p. 318-25.

70. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 124-32.
71. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells*. Diabetologia, 1999. **42**(7): p. 856-64.
72. Trumper, A., K. Trumper, and D. Horsch, *Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)-cells*. J Endocrinol, 2002. **174**(2): p. 233-46.
73. Srinivasan, S., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 968-75.
74. Jope, R.S. and G.V. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(2): p. 95-102.
75. Song, L., P. De Sarno, and R.S. Jope, *Central role of glycogen synthase kinase-3beta in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44701-8.
76. Mallo, G.V., et al., *Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32360-9.
77. Jiang, Y.F., et al., *Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 686-90.
78. Garcia-Montero, A., et al., *Expression of the stress-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change*. Eur J Cell Biol, 2001. **80**(11): p. 720-5.
79. Vasseur, S., et al., *Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBPbeta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter*. Biochem J, 1999. **343 Pt 2**: p. 377-83.
80. Vasseur, S., et al., *Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity*. Eur J Biochem, 1999. **259**(3): p. 670-5.
81. Igarashi, T., et al., *Cloning and characterization of the Xenopus laevis p8 gene*. Dev Growth Differ, 2001. **43**(6): p. 693-8.
82. Liu, Z., et al., *Characterization, expression, and response to stress of p8 gene in amphioxus*. Fish Shellfish Immunol, 2009. **27**(3): p. 407-13.
83. Courjal, F. and C. Theillet, *Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4368-77.
84. Chowdhury, U.R., et al., *Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer biology*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 225-32.
85. Bustin, M. and R. Reeves, *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1996. **54**: p. 35-100.

86. Wood, L.J., et al., *HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5490-502.
87. Hoffmeister, A., et al., *The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22314-9.
88. Clark, D.W., et al., *NUPR1 interacts with p53, transcriptionally regulates p21 and rescues breast epithelial cells from doxorubicin-induced genotoxic stress*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(5): p. 421-30.
89. Malicet, C., et al., *Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2671-6.
90. Encinar, J.A., et al., *Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2742-51.
91. Malicet, C., et al., *p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 37.
92. Goruppi, S., et al., *Helix-loop-helix protein p8, a transcriptional regulator required for cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast matrix metalloprotease induction*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 993-1006.
93. Ree, A.H., et al., *Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4675-80.
94. Soulier, J., et al., *The MTCP-1/c6.1B gene encodes for a cytoplasmic 8 kD protein overexpressed in T cell leukemia bearing a t(X;14) translocation*. Oncogene, 1994. **9**(12): p. 3565-70.
95. Vasseur, S., et al., *p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(11): p. 1685-94.
96. Ito, Y., et al., *Expression and cellular localization of p8 protein in thyroid neoplasms*. Cancer Lett, 2003. **201**(2): p. 237-44.
97. Su, S.B., et al., *Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(5): p. 1320-4.
98. Su, S.B., et al., *Expression of p8 in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(2): p. 309-13.
99. Bratland, A., et al., *Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells*. Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5578-83.
100. Vasseur, S., et al., *p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene*. EMBO Rep, 2002. **3**(2): p. 165-70.
101. Ruley, H.E., *Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes*. Cancer Cells, 1990. **2**(8-9): p. 258-68.
102. Carracedo, A., et al., *The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 301-12.
103. Jiang, W.G., et al., *Com-1/p8 acts as a putative tumour suppressor in prostate cancer*. Int J Mol Med, 2006. **18**(5): p. 981-6.
104. Garcia-Montero, A.C., et al., *Transforming growth factor beta-1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 249-53.

105. Goruppi, S., J.V. Bonventre, and J.M. Kyriakis, *Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy*. EMBO J, 2002. **21**(20): p. 5427-36.
106. Goruppi, S. and J.M. Kyriakis, *The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20950-8.
107. Quirk, C.C., D.D. Seachrist, and J.H. Nilson, *Embryonic expression of the luteinizing hormone beta gene appears to be coupled to the transient appearance of p8, a high mobility group-related transcription factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1680-5.
108. Vasseur, S., et al., *p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7199-207.
109. Keim, V., J.L. Iovanna, and J.C. Dagorn, *The acute phase reaction of the exocrine pancreas. Gene expression and synthesis of pancreatitis-associated proteins*. Digestion, 1994. **55**(2): p. 65-72.
110. Dagorn, J.C., *Acute phase reaction of the exocrine pancreas*. Digestion, 1997. **58 Suppl 1**: p. 50-2.
111. Tribl, B., et al., *Pseudomonas pneumonia-mediated sepsis induces expression of pancreatitis-associated protein-I in rat pancreas*. Pancreas, 2004. **29**(1): p. 33-40.
112. Malka, D., et al., *Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation*. Gastroenterology, 2000. **119**(3): p. 816-28.
113. Lim, J.W., et al., *Role of pancreatitis-associated protein 1 on oxidative stress-induced cell death of pancreatic acinar cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1171**: p. 545-8.
114. Savkovic, V., et al., *The stress response of the exocrine pancreas*. Dig Dis, 2004. **22**(3): p. 239-46.
115. Zinke, I., et al., *Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response*. EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6162-73.
116. Path, G., et al., *Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S82-5.
117. Gironella, M., et al., *p8/nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand gamma irradiation-induced DNA damage*. J Cell Physiol, 2009.
118. Sambasivan, R., et al., *The small chromatin-binding protein p8 coordinates the association of anti-proliferative and pro-myogenic proteins at the myogenin promoter*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3481-91.
119. Iovanna, J., et al., *Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24664-9.
120. Frigerio, J.M., et al., *Identification of a second rat pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning, gene structure, and expression during acute pancreatitis*. Biochemistry, 1993. **32**(35): p. 9236-41.

121. Dusetti, N.J., et al., *Cloning, expression and chromosomal localization of the rat pancreatitis-associated protein III gene*. *Biochem J*, 1995. **307 ( Pt 1)**: p. 9-16.
122. Rouquier, S., et al., *Rat pancreatic stone protein messenger RNA. Abundant expression in mature exocrine cells, regulation by food content, and sequence identity with the endocrine reg transcript*. *J Biol Chem*, 1991. **266(2)**: p. 786-91.
123. Iovanna, J.L., P. Lechene de la Porte, and J.C. Dagorn, *Expression of genes associated with dedifferentiation and cell proliferation during pancreatic regeneration following acute pancreatitis*. *Pancreas*, 1992. **7(6)**: p. 712-8.
124. Calvo, E.L., et al., *Downregulation of IGF-I mRNA expression during postnatal pancreatic development and overexpression after subtotal pancreatectomy and acute pancreatitis in the rat pancreas*. *J Mol Endocrinol*, 1997. **18(3)**: p. 233-42.
125. Halban, P.A., G.A. Praz, and C.B. Wollheim, *Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F)*. *Biochem J*, 1983. **212(2)**: p. 439-43.
126. Knaack, D., et al., *Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness*. *Diabetes*, 1994. **43(12)**: p. 1413-7.
127. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. *Endocrinology*, 1992. **130(1)**: p. 167-78.
128. Miyazaki, J., et al., *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms*. *Endocrinology*, 1990. **127(1)**: p. 126-32.
129. Noda, M., M. Komatsu, and G.W. Sharp, *The betaHC-9 pancreatic beta-cell line preserves the characteristics of progenitor mouse islets*. *Diabetes*, 1996. **45(12)**: p. 1766-73.
130. Skelly, R.H., et al., *A distinct difference in the metabolic stimulus-response coupling pathways for regulating proinsulin biosynthesis and insulin secretion that lies at the level of a requirement for fatty acyl moieties*. *Biochem J*, 1998. **331 ( Pt 2)**: p. 553-61.
131. Ferber, S., et al., *GLUT-2 gene transfer into insulinoma cells confers both low and high affinity glucose-stimulated insulin release. Relationship to glucokinase activity*. *J Biol Chem*, 1994. **269(15)**: p. 11523-9.
132. Clark, S.A., et al., *Novel insulinoma cell lines produced by iterative engineering of GLUT2, glucokinase, and human insulin expression*. *Diabetes*, 1997. **46(6)**: p. 958-67.
133. Hohmeier, H.E., et al., *Regulation of insulin secretion from novel engineered insulinoma cell lines*. *Diabetes*, 1997. **46(6)**: p. 968-77.
134. Cheatham, B., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14(7)**: p. 4902-11.
135. Myers, M.G., Jr., et al., *Insulin receptor substrate-1 mediates phosphatidylinositol 3'-kinase and p70S6k signaling during insulin, insulin-like growth factor-1, and interleukin-4 stimulation*. *J Biol Chem*, 1994. **269(46)**: p. 28783-9.

136. Frodin, M., et al., *Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7882-9.
137. Hofmann, C., M.F. White, and J. Whittaker, *Human insulin receptors expressed in insulin-insensitive mouse fibroblasts couple with extant cellular effector systems to confer insulin sensitivity and responsiveness*. Endocrinology, 1989. **124**(1): p. 257-64.
138. Hohmeier, H.E., et al., *Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 424-30.
139. Ramiya, V.K., et al., *Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 278-82.
140. Bonner-Weir, S., et al., *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7999-8004.
141. Soria, B., et al., *Engineering pancreatic islets*. Pflugers Arch, 2000. **440**(1): p. 1-18.
142. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
143. Alexandrow, M.G. and H.L. Moses, *Transforming growth factor beta 1 inhibits mouse keratinocytes late in G1 independent of effects on gene transcription*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3928-32.
144. Moses, H.L., E.Y. Yang, and J.A. Pietenpol, *TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights*. Cell, 1990. **63**(2): p. 245-7.
145. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 1-9.
146. Kretzschmar, M. and J. Massague, *SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(1): p. 103-11.
147. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. EMBO J, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
148. Wrana, J.L., *Regulation of Smad activity*. Cell, 2000. **100**(2): p. 189-92.
149. Wrana, J.L. and L. Attisano, *The Smad pathway*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 5-13.
150. Iovanna, J.L., *Expression of the stress-associated protein p8 is a requisite for tumor development*. Int J Gastrointest Cancer, 2002. **31**(1-3): p. 89-98.
151. Moore, P.S., et al., *Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4*. Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 798-802.
152. Aoki, K., et al., *Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3810-6.
153. Ding, X.Z. and T.E. Adrian, *MEK/ERK-mediated proliferation is negatively regulated by P38 map kinase in the human pancreatic cancer cell line, PANC-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(2): p. 447-53.
154. Gahr, S., et al., *Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of pancreatic beta-cells particularly in the presence of subphysiological glucose concentrations*. J Mol Endocrinol, 2002. **28**(2): p. 99-110.



### Danksagung

Ich danke

Herrn **Prof. Dr. med. K. Wilms** für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Doktorarbeit erstellen zu dürfen.

Herrn **Prof. Dr. med. G. Ertl** für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik beenden zu können.

Frau **Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs** für die freundliche Übernahme des Korreferates.

ganz besonders Frau **Priv.-Doz. Dr. med. Sigrun Merger**, nicht allein für die Bereitstellung der Arbeit sondern vielmehr für die sehr gute Betreuung über diese lange Zeit hinweg. Von der ersten Aussaat der INS-1-Zellen bis hin zum Abschluss dieser Arbeit war sie mir Mentorin und Lehrerin. Durch ihr ausgezeichnetes Fachwissen, ihr Engagement und ihre Fürsorge trug sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn **Prof. Dr. med. Jochen Seufert** für Ideen, Diskussionen und Lösungsvorschläge, die wir bei unseren Arbeitsgruppentreffen und auf manchen Kongressen erarbeitet haben. Auch sein Engagement, diese Arbeit zu vervollkommen, war vorbildlich. So kam es mir häufig vor, Doktoreltern statt nur eines Doktorvaters bzw. einer Doktormutter zu haben.

Herrn **Dr. Günter Päth** aus dem Bereich Endokrinologie, Stoffwechsel und Molekulare Medizin, der mir einiges an Methodik und Statistik beibrachte und mich zudem mit vielen Materialien wie Zellen, Antikörper und Plasmiden versorgt hat.

## Danksagung

---

Aus dem Bereich der Molekularen Inneren Medizin der Arbeitsgruppe um **Prof. Harald Wajant** mit **Dr. Frank Henkler** und **Dr. Daniela Siegmund**. Ihr wart ein wissenschaftlicher Nährboden und habt mich zu vielen Ideen und Denkansätzen inspiriert.

Allen, die ich noch nicht erwähnt habe, aber gleichsam wichtig für diese Arbeit waren.

Der Firma **Microsoft**, dass sie es endlich geschafft hat, ein Office-Programm zu erstellen, mit dem man 25.000 Worte am Stück schreiben kann, ohne dass gleich die Formatierung nebst zahlreicher Nerven zusammenbricht.

Meinen **Freunden** für die ständige Erinnerung an die noch ausstehende Fertigstellung der Doktorarbeit. Wie Ihr seht, hat es doch noch geklappt.

Meinen **Eltern**, zwei wundervollen Menschen ohne die ich heute nicht derjenige wäre, der ich bin, weil sie mir so viel Liebe schenken und nie aufgaben.

Meinem kleinen Engel **Elisa**. Du machst mich so glücklich und bringst mich immer wieder zum Lachen. Du weckst die besten Seiten an mir und bist da, wenn man Dich braucht. Das Leben mit Dir ist ein verrücktes Abenteuer und wahnsinnig schön. Ich liebe Dich.

## Curriculum vitae

### LARS ROMFELD

---

Geburtsdatum	30.03.1976
Geburtsort	Memmingen
Familienstand	verheiratet

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

1982-1986	Grundschule Erkheim
1986-1992	Rupert-Ness-Gymnasium Ottobeuren
1992-1995	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
1995	Allgemeine Hochschulreife

### BERUFLICHE AUSBILDUNG

---

10/1995 – 07/1996	Grundwehrdienst als Stabsdienstsoldat im Geschäftszimmer des Fliegerarztes
09/1996 – 07/1998	Ausbildung zum Bankkaufmann in der Sparkasse Memmingen-Mindelheim
07/1998 – 08/1998	Bankkaufmann in der Sparkasse Memmingen-Mindelheim
10/1998 – 01/1999	Krankenpflegepraktikum in der Chirurgischen Abteilung des Juliuspitals Würzburg

## Lebenslauf

---

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

---

04/1999 – 05/2006	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2001	Physikum
08/2002	1. Staatsexamen
04/2005	2. Staatsexamen
05/2006	3. Staatsexamen
10.05.2006	Approbation als Arzt

### PRAKTISCHES JAHR

---

Chirurgie:	Missionsärztliche Klinik in Würzburg (04/2005 – 08/2005) Prof. Dr. med. Hans-Günter Koebe
Neurologie:	Neurologische Univ.-klinik in Würzburg (08/2005 – 11/2005) Prof. Dr. med. Klaus Toyka
Innere Medizin:	Missionsärztliche Klinik in Würzburg (11/2005 – 03/2006) Prof. Dr. med. Berthold Jany

### KLINISCHE TÄTIGKEIT

---

08/2006-07/2008	Assistenzarzt in der Sozialstiftung Bamberg, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I für Kardiologie, Elektrophysiologie und Palliativmedizin Prof. Dr. med. Bernhard Kunkel
seit 07/2008	Assistenzarzt im Klinikum Passau, Medizinische Klinik III für Kardiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin Prof. Dr. med. Dietmar Elsner

---

Passau, September 2009