

Aus der Abteilung Pharmakologie
(Prof. Dr. med. W. H. Zimmermann)
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Identifikation einer
funktionellen Kernerkennungssequenz in der
Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Manuel Wallbach

aus Göttingen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. E. Oetjen

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Apoptose	3
1.3 Ursachen für die gesteigerte Beta-Zell-Apoptose und den Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse	5
1.4 Proinflammatorische Zytokine in der Pathogenese des Diabetes Typ II	8
1.5 JNK als zentrales Protein der Zytokinsignalkaskade	10
1.6 Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen)	11
1.7 Die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK)	12
1.8 Einfluss der DLK auf CREB und das Überleben der Beta-Zelle	14
1.9 Kompartimentierung und nukleozytoplasmatischer Transport von Proteinen	15
1.10 Fragestellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	19
2.2 Chemische und biologische Materialien	22
2.2.1 Chemikalien	22
2.2.2 Antibiotika	24
2.2.3 Kits	25
2.2.4 Antikörper	25
2.2.5 Expressionsvektoren	26
2.2.6 Reportergenplasmide	27
2.2.7 Oligonukleotide	28
2.2.8 Bakterienstämme	29
2.2.9 Transformation kompetenter E.coli	29

2.3 Zellkultur	30
2.3.1 Zelllinie HIT-T15	30
2.3.2 Kultivierung	30
2.3.3 Langzeitaufbewahrung, Gefrierkonservierung und Revitalisierung	32
2.4 Arbeiten mit DNA	33
2.4.1 Zielgerichtete Mutagenese	33
2.4.2 Restriktionsenzymverdau	37
2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	39
2.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	40
2.4.6 Klonierung	40
2.4.7 Ligation von DNA	42
2.4.8 Restriktionsenzymverdau der klonierten Expressionsvektoren	42
2.4.9 Sequenzierung von DNA	42
2.4.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	45
2.4.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	46
2.5 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	49
2.5.1 METAFECTENE® - Methode	49
2.5.2 DEAE-Dextran-Methode	51
2.6 Proteincharakterisierung	52
2.6.1 Zellyse	52
2.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes	53
2.6.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.6.4 Western Blot	56
2.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen	58
2.6.6 Wiederaufbereitung von Nitrocellulosemembranen	59
2.7 Zellfraktionierung	59
2.8 Luciferase-Reporter-Gen-Assay	62
2.8.1 Präparation der Zellextrakte	63
2.8.2 Messung der Luciferase-Aktivität	64
2.8.3 GFPtpz-Messung	65

2.9 Immunzytochemie	65
2.9.1 Immunzytochemische Färbung	66
2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie	68
2.10 Immunogold-Elektronenmikroskopie	68
2.10.1 Herstellung von kolloidalem Gold	69
2.10.2 Antikörper koppeln	69
2.10.3 Ausplattierung und Transfektion	70
2.10.4 Präparation und Fixierung	70
2.10.5 Mikrotom	71
2.10.6 Antikörperreaktion und Kontrastierung	72
2.10.7 Mikroskopieren und Bearbeitung der Bilder	73
2.11 Auswertung und Statistik	74
3. Ergebnisse	75
3.1 Subzelluläre Lokalisation der DLK in der Beta-Zelllinie HIT-T15	75
3.1.1 Lokalisation der DLK und deren Beeinflussung durch TNF- α und IL-1 β	75
3.1.2 Einfluss der JNK-Aktivierung auf die Translokation der DLK	80
3.1.3 Ultrastrukturelle Analyse durch Immunogold-Elektronenmikroskopie	81
3.1.4 Identifizierung der DLK-Lokalisation in HIT-T15-Zellen mittels Zellfraktionierung	84
3.2 Charakterisierung einer Kernerkennungssequenz	86
3.2.1 Analyse der Primärstruktur der DLK	86
3.2.2 Herstellung von DLK-Mutanten mit veränderten Kernerkennungssequenzen	87
3.2.3 Einfluss der Mutation der Kernerkennungssequenz auf die Lokalisation von DLK	88
3.3 Effekt der DLK-NLS-Mutanten auf die CREB-abhängige Gentranskription	90
3.3.1 Expression der DLK-Mutanten in HIT-T15-Zellen	91
3.3.2 Phosphorylierung von JNK als Maß für die katalytische Aktivität der DLK-Mutanten	91
3.3.3 Auswirkung der DLK-Mutanten auf die CRE-abhängige Gentranskription	94

3.3.4	Auswirkung der DLK-Mutanten auf die CREB-abhängige Gentranskription	96
3.3.5	Einfluss der DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CBP	98
3.3.6	Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität der CREB- Transaktivierungsdomäne	100
3.4	Auswirkung der DLK-Mutanten auf die Apoptoserate der Beta-Zellen	102
4.	Diskussion	104
4.1	Die subzelluläre Lokalisation der DLK innerhalb einer Beta-Zelllinie	104
4.2	Eine Hemmung der JNK-Aktivierung führt zu einer Verminderung der DLK-Translokation in den Kern	114
4.3	Die Apoptose-induzierende Wirkung der DLK auf die Beta-Zelle ist abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation	116
4.4	Mögliche Mechanismen einer DLK-induzierten Apoptose	117
4.5	Auswirkungen einer DLK-Hemmung	121
5.	Zusammenfassung	123
6.	Anhang	124
7.	Literaturverzeichnis	125

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AMP	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	Apoptotic Protease Activation Factor-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL-2 associated death promotor
BAX	BCL-2 associated X Protein
BCL-2	B-cell leukaemia/lymphoma-2
BCL-xl	B-cell lymphoma-extra large
BID	BH3-interacting domain-death agonist
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BS	Bluescript
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain
°C	Grad Celsius
CAD	Caspase-aktivierte DNase
Caspasen	Cysteine aspartyl-specific proteases
CBP	CREB binding protein
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
c-fos	FBJ murine osteosarkoma viral oncogene
CHIP	HSC70-interacting protein
c-jun	Jun Oncogene
CMV	Zytomegalie-Virus
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DDP-IV	Dipeptidyl peptidase-4
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DLK	Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase
DLK-1	DAP (Death Associated Protein kinase) Like Kinase family member
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FADD	Fas-Associated Death Domain
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green fluorescent protein
GFPtpz	Green fluorescent protein topaz gold
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HIT	Hamster Insulinoma Tumor
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRS-1	Insulin Receptor Substrat-1
IRS-2	Insulin Receptor Substrat-2
JIP	JNK-interacting protein
JNK	C-jun N-terminal kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilo basen
KID	Kinase inducible domain
LB	Luria Bertani
LZK	Leucine-Zipper-Bearing Kinase
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase Kinase
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
min	Minuten
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MLK	Mixed lineage kinase
MUK	Mitogen-Activated Protein Kinase Upstream Kinase
NFAT1	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLS	Nuclear localization signal (Kernerkennungs- sequenz)
NPC	Nuclear pore complex
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii (pH-Wert)
PHR-1	PAM, Highwire, RPM-1
P-JNK	Phosphoryliertes JNK
PKA	Proteinkinase A
POSH	Plenty of SH39

Abkürzungsverzeichnis

PP _i	Pyrophosphat
Ran	Ras-related Nuclear protein
RLU	Relative Lichteinheiten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM-1	Regulator of presynaptic morphology
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases
SV-40	Siminian-Virus 40
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TORC	Transducer of Regulated CREB
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
UKPDS	United Kingdom Prospective Study
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Vgl.	Vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
ZPK	Leucine Zipper Protein Kinase

Zur Abkürzung von Aminosäurenamen wurde der Einbuchstabencode verwendet.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnr.	Titel	Seite
1.1	Mediatoren mit Einfluss auf den Abfall der funktionellen Beta-Zellmasse (abgewandelt von Donath et al 2003, S. 461)	7
1.2	Schematische Darstellung des MAP-Kinase-Signalweges	11
1.3	Schema der Primärstruktur der DLK (nach Holzman et al. 1994, S. 30813)	12
1.4	Schematische Darstellung des Kernimportes über die Kernmembran (abgewandelt von Karlsons Biochemie, 15. Auflage, Doenecke et al. 2005, S. 375)	17
2.1	Expressionsvektor pcDNA3.	27
2.2	Schematische Darstellung der Reportergene	28
2.3	Mutagenese der DLK-NLS-1- und -NLS-2-Mutanten	34
2.4	Zielgerichtete Mutagenese	35
2.5	DLK-Konstrukte innerhalb des Expressionsvektors pcDNA3	41
2.6	Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford	53
2.7	Aufbau der Transferkammer	56
2.8	Reaktionsgleichung der Luciferasereaktion	63
2.9	Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops	66
3.1	Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HIT-Zellen	76
3.2	Score zur Beurteilung der subzellulären Lokalisation der DLK in HIT-Zellen	76
3.3	Immunfluoreszenzmikroskopische Differenzierung der DLK-Lokalisation in vier Stadien	77-78
3.4	Zeit-Wirkungskurve der DLK-Lokalisation in HIT-Zellen unter Einfluss der Zytokine TNF- α (A) und IL-1 β (B)	79
3.5	Einfluss der JNK-Aktivität auf die Translokation	81
3.6	A Elektronenmikroskopisches Bild einer HIT-Zelle. B Vergrößerter Bildausschnitt	82
3.7	Ultrastrukturelle Darstellung der Lokalisation von DLK und der Mutante DLK K185A in HIT-Zellen	83
3.8	Einfluss von TNF- α auf die Lokalisation der DLK in HIT-Zellen	84-85
3.9	Zellfraktionierung nach Methode 2	86
3.10	Sequenzvergleich der zweiteiligen Kernerkennungssequenz zwischen den DLK-Homologen DLK, ZPK, MUK, Wallenda (siehe Kap. 1.7), dem Nucleoplasmin und dem Östrogenrezeptor	87
3.11	Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der transient transfizierten HIT-Zellen	89
3.12	Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie	90
3.13	Expression der DLK-Mutanten in HIT-Zellen	91
3.14	Auswirkung der einzelnen DLK-Mutanten auf den Phosphorylierungsgrad von JNK	92-93
3.15	Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die durch Membrandepolarisation stimulierte Gentranskription	94-95

3.16	Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CREB	96-97
3.17	Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität CBP	98-99
3.18	Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität der CREB-Transaktivierungsdomäne	100-101
3.19	Immunzytochemische Doppelfärbung von HIT-Zellen mit Anti-FLAG-M2 (rot) und Anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper (grün)	102
3.20	Auswirkung der NLS-Mutanten auf die Beta-Zell-Apoptose	103
4.1	Feed-forward loop – Signalamplifikation der DLK-Aktivierung	115
4.2	Zusammenfassung der skizzierten Mechanismen zur Translokation der DLK und deren Auswirkung auf die Beta-Zellfunktion und –Apoptose	120

Tabellennr.	Überschrift	Seite
2.1	Oligonukleotide	28
2.2	Aminosäuresequenz der DLK-Mutanten	33
2.3	Aminosäureaustausch und entsprechende Basenmutationen zur Herstellung der DLK-NLS-Mutanten	34
2.4	PCR-Ansätze	36
2.5	PCR-Programme im PCR-Gradientencycler	36
2.6	Restriktionsendonukleasen	37
2.7	Agarosekonzentrationen	38
2.8	PCR-Programm für die Sequenzierung	43
2.9	Pipettierschema der METAFECTENE [®] -Methode	50
2.10	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele	54
2.11	Verdünnung der verwendeten primären Antikörper	59
2.12	verwendete Antikörper für die Elektronenmikroskopie	72
3.1	Ausschnitt der Aminosäuresequenz der DLK-Mutanten	87
3.2	Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die basale CRE-abhängige Gentranskription	95
3.3	Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CREB unter basalen Bedingungen	97
3.4	Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CBP unter basalen Bedingungen	99
3.5	Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität der CREB-Transaktivierungsdomäne unter basalen Bedingungen	101

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Pankreatische Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln sind die Produzenten des Peptidhormons Insulin, welches für die systemische Regulation des Glukosehaushaltes benötigt wird. Die Insulinsekretion der Beta-Zellen wird durch einen erhöhten Blutspiegel an Glukose, Proteinen, Lipiden und anderen Makromolekülen sowie neuralen Einflüsse stimuliert und bewirkt eine verstärkte Glukoseaufnahme in die Zellen sowie eine Hemmung der Glukoneogenese in peripheren Geweben. Defekte bei der Insulinsynthese oder -sekretion resultieren in erhöhte Blutglukosespiegel, Glukoseintoleranz und Diabetes mellitus (Heit 2007).

Beim Diabetes mellitus (griech. „honigsüßer Durchfluss“) handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung. Es existieren einzelne Unterformen, bei denen entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine gestörte Insulinwirkung oder eine Kombination von beidem zugrunde liegen. In der Folge treten nach chronischer Hyperglykämie Schäden an den Augen, Blutgefäßen, der Niere und dem Nervensystem auf (Herold 2007). 2006 waren 246 Millionen Menschen vom Diabetes mellitus betroffen und Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahr 2030 439 Millionen Menschen erkrankt sein werden (International Diabetes Federation 2009). Bereits 1965 wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Empfehlungen zur Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus gegeben. Die Amerikanische Diabetes-Gesellschaft (American Diabetes Association) revidierte 1997 die Kriterien und unterteilte die Erkrankung nach der Ätiologie in vier Kategorien: den Typ-I- und Typ-II-Diabetes, sog. andere, spezifische Diabetesformen (Typ III) sowie den Gestationsdiabetes (Typ IV), welcher sich nach einer Schwangerschaft meist wieder zurückbildet (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2002). Fünf Prozent entfallen hierbei auf den Typ-I-Diabetes, der vorwiegend im jüngeren Alter auftritt. Es handelt sich bei dieser Form um eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in der Langerhanschen Insel des Pankreas, die zu einem absoluten Insulinmangel führt. Meistens können bei der Beta-Zellzerstörung autoimmunologische Prozesse (Typ Ia) nachgewiesen werden. Dabei kommt es durch Produktion der B-Zellen zum Auftreten von Antikörpern gegen Beta-Zellantigene sowie zu einer T-Zell-vermittelten, inflammatorischen Antwort in den Inseln (Daneman 2006). In seltenen Fällen handelt sich um den idiopathischen Typ Ib. 1986 stellte Eisenbarth ein Modell zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I auf, indem er postulierte,

dass jeder Mensch eine gewisse Disposition für eine Entwicklung von Diabetes mellitus Typ I hat und sich die Krankheit durch entsprechende Umwelteinflüsse manifestiert. Eine genetische Ursache, wie z.B. die Ausprägung der HLA (Human Leucocyte Antigene)-Merkmale HLA-DR3 oder -DR4, scheinen zusammen mit Umwelteinflüssen, wie Virusinfekten oder Toxinen, die Ätiologie zu bestimmen (Daneman 2006). Die Symptome des Diabetes mellitus Typ I treten meist abrupt auf und sind gekennzeichnet durch Polyurie, Polydypsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust (Kerner et al. 2004). Die Therapie besteht in der Substitution des fehlenden Insulins. Der weitaus größere Anteil der Diabetesformen entfällt jedoch mit 90 % auf den Typ-II-Diabetes. Der Typ-II-Diabetes ist vornehmlich eine Erkrankung des mittleren und höheren Erwachsenenalters. Neuere Studien zeigen jedoch auch eine Relevanz der Erkrankung bei Kindern (Rosenbloom et al. 1999, Dabelea et al. 1999). Zur Jahrtausendwende waren weltweit 171 Millionen Menschen vom Typ-II-Diabetes betroffen und Schätzungen zufolge steigt die Zahl der Betroffenen bis zum Jahr 2030 auf 366 Millionen an (Wild et al. 2004). Der drastische Anstieg der Prävalenz geht mit der Zunahme von Adipositas in der Bevölkerung einher (Rhodes 2005). Aufgrund der weiten Verbreitung, der hohen Rate an Sekundärkomplikationen, wie beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen, und wirtschaftlichen Folgen der Erkrankung ist der Typ-II-Diabetes eine Volkskrankheit von größter Aktualität und Wichtigkeit und daher Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Die Erkrankung verläuft im Gegensatz zum Typ-I-Diabetes schleichend, verursacht unspezifische Allgemeinsymptome und wird meistens erst im Rahmen von Routineuntersuchungen diagnostiziert. Im Verlauf der chronischen Erkrankung treten jedoch die zuvor geschilderten Sekundärkomplikationen auf. Die Therapie besteht derzeit neben der Gewichtsnormalisierung und Steigerung der körperlichen Aktivität aus der Behandlung mit oralen Antidiabetika sowie der Prophylaxe und Therapie der Folgeerkrankungen. Die oralen Antidiabetika steigern die Insulinsekretion, wirken inhibierend auf die hepatische Glukoneogenese, hemmen die Glukoseaufnahme im Darm oder führen als „Insulin-sensitizer“ zu einer verbesserten Empfindlichkeit peripherer Zellen auf Insulin. Ein Beta-Zell-protektiver Effekt geht von diesen Medikamenten nicht aus. Reichen orale Antidiabetika im Verlauf der Erkrankung nicht mehr zur Therapie aus, so wird eine Insulintherapie begonnen.

Der Diabetes mellitus Typ II entwickelt im Vergleich zum Typ I eine wesentlich langsamere Insulinabhängigkeit. Die Erkrankungen unterscheiden sich in ihrer Dynamik, doch der zugrunde liegende Mechanismus der Beta-Zell-Apoptose scheint nach Meinung von Donath et al. (2003) derselbe zu sein. Andere Autoren sehen diesen Punkt jedoch anders und trennen die Pathophysiologie beider Subtypen, da es beim Diabetes Typ II, anders als beim Typ I, nicht zu einer Infiltration mit T-Lymphozyten kommt und sich folglich auch keine für den Typ I charakteristische Insulitis ausbildet.

Obwohl bereits 1955 von McLean vorgeschlagen wurde, dass der Verlust an Beta-Zellmasse eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen könnte, bestand bis vor 20 Jahren in der wissenschaftlichen Welt Konsens darüber, dass die Ursache des Diabetes Typ II allein durch eine periphere Insulinresistenz in Fettgewebe, Muskel und Leber begründet sei (Reaven et al. 1988). Der gleichzeitig auftretenden Erkrankung der Beta-Zellen wurde keine Relevanz für die Pathogenese zugeschrieben. Sie galt als krankheitsbedingter Spätschaden. Heutzutage spielt die Beta-Zelldysfunktion für das Verständnis der Wissenschaft im Hinblick auf die Pathogenese des Diabetes Typ II eine große Rolle (Kahn 2003, Butler et al. 2003). Sowohl die periphere Insulinresistenz als auch die Beta-Zelldysfunktion scheinen schon in sehr frühen Krankheitsstadien aufzutreten und charakterisieren die zwei entscheidenden Komponenten dieser Erkrankung (Kahn 2003). Pankreatische Beta-Zellmasse wird durch das Zusammenspiel von Zellgröße, Proliferation, Neogenese aus Vorläuferzellen und der Apoptose reguliert (Rhodes 2005). Dieses komplexe Zusammenspiel erlaubt eine Adaptation der Beta-Zellmasse auf veränderte metabolische Anforderungen (Rhodes 2005; Butler et al. 2003). Die durch Adipositas ausgelöste periphere Insulinresistenz mit konsekutiver Hyperinsulinämie und verminderter Glukosetoleranz wird über einen langen Zeitraum durch Beta-Zellhypertrophie und -hyperplasie kompensiert (Butler et al. 2003; Rhodes 2005). Basierend auf den Daten der UKPDS (United Kingdom Prospective Study) und der longitudinalen Studie an Pima-Indianern (Weyer et al. 1999), ist die Ursache für den mit der Zeit einsetzenden Abfall der Glukosetoleranz und somit die Manifestation des Diabetes mellitus Typ II in einem kontinuierlichen Verlust von funktioneller Beta-Zellmasse zu sehen (Butler et al. 2003; Donath et al. 2003; Rhodes 2005, Hotamisligil 2006). Butler et al. (2003) haben eine erhöhte Rate an Beta-Zell-Apoptosen sowie eine verminderte Beta-Zellmasse in humanen Inseln von Patienten mit Diabetes Typ II feststellen können. Der zentrale Mechanismus, der zu einem Verlust der Beta-Zellmasse führt, ist die stark gesteigerte Apoptoserate, die nicht durch Replikation und Neogenese kompensiert werden kann (Rhodes 2005, Butler et al. 2003). Beta-Zell-Apoptose könnte daher ein gemeinsamer Bestandteil des Typ-I- und Typ-II-Diabetes sein (Cnop et al. 2005).

1.2 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Dieser Mechanismus stellt die physiologische Form des Zelltodes dar. Zu Beginn der Apoptose löst sich die Zelle vom umliegenden Gewebe ab, fängt an zu schrumpfen und zeigt nach einiger Zeit bläschenförmige Ausstülpungen auf der Zelloberfläche. Das Chromatin im Zellkern kondensiert, die DNA wird fragmentiert und der Zellkern zerfällt. Diese Fragmente werden mit anderen Organellen von

der Zelle in sogenannten apoptotischen Körperchen abgeschnürt. Die apoptotischen Körperchen werden von Nachbarzellen und Makrophagen phagozytiert. Es kommt zu keiner Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe (Raff 1998). Dabei ist ein geregelter Ablauf der Apoptose essentiell für jeden mehrzelligen Organismus. Sie spielt bei der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Stadium, z.B. beim Immunsystem, eine wichtige Rolle. Darüber hinaus reguliert die Apoptose die Aufrechterhaltung einer konstanten Größe und Zellzahl von proliferativen Geweben, wie z.B. der Haut oder des Darmes. Infizierte oder beschädigte Zellen werden im Organismus durch Apoptose eliminiert. Sowohl zu viel als auch zu wenig Apoptose kann pathologisch sein. Während bei vielen Karzinomen aufgrund eines fehlerhaften Apoptoseprogramms die Elimination entarteter Zellen nicht gelingt, führt eine gesteigerte Rate an Apoptose beispielsweise zur Abnahme der funktionellen Beta-Zellmasse oder zu neurodegenerativen Erkrankungen (Kermer et al. 2004).

Der apoptotische Prozess läuft kontrolliert nach einem genetisch festgelegten Programm ab, welches hoch konserviert ist. Es werden vereinfacht zwei Hauptwege unterschieden, die zur Einleitung der Apoptose führen können. Es handelt sich dabei um einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg. Wesentlicher Bestandteil der Apoptosekaskade sind die sog. Caspasen (cysteine aspartyl-specific proteases), die zu einer Familie intrazellulärer Cysteinproteasen gehören. Zu ihren Substraten gehören beispielsweise Proteinkinasen, Proteine des Zytoskeletts und der nukleären Matrix sowie DNA-Reparaturproteine, die über die Spaltung an Aspartat-Resten aktiviert werden können (Alnemri et al. 1996).

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch die Bindung von Liganden an Rezeptoren der TNF-Familie, wie z.B. TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) oder CD95 in der Zellmembran initiiert. Dieser Apoptoseweg kann durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IFN- γ induziert werden. Die aktivierten Rezeptoren interagieren mit Adapterproteinen wie z.B. FADD (Fas-Associated Death Domain). Der gebildete Komplex aus Rezeptor und Adapterprotein bindet und aktiviert die Initiatorcaspase-8. Caspase-8 aktiviert schließlich die Effektorcaspase-3, die den Tod der Zelle einleitet (Hengartner 2000).

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch mitochondrialen Stress initiiert, wie z.B. DNA-Schädigung, erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53, oxidativen oder metabolischen Stress. Dies führt zur Steigerung der Permeabilität der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Apoptose-relevanten Molekülen, wie z.B. Cytochrom-C, SMAC (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases) und AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Dieser Prozess wird durch Proteine der BCL-2 Familie kontrolliert und moduliert. Es existieren dabei sowohl pro- (z.B. BAX, BAD, BID) als auch anti-apoptotische (z.B. BCL-2, BCL-xl) Proteine (Reed 2000). Nachdem Cytochrom-C ins Zytoplasma gelangt ist, bildet es zusammen mit

Apaf-1 (Apoptotic Protease Activation Factor-1) und Caspase-9 einen oligomeren Komplex, das Apoptosom, welches zur Aktivierung von Caspase-9 führt (Li et al. 1997). Die aktivierte Caspase-9 spaltet und aktiviert schließlich die Effektorcaspase-3, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist (Hengartner 2000).

Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg münden somit in einer Aktivierung von Caspase-3. Dieser Schritt führt weiter zu einer Aktivierung von Apoptose-Effektorproteinen, wie z.B. der Caspase-aktivierten DNase (CAD), die zur Fragmentierung der chromosomalen DNA führt. Darüber hinaus wird eine Reihe weiterer Proteine proteolytisch aktiviert, die alle zu Abbau und Eliminierung der Zelle beitragen.

1.3 Ursachen für die gesteigerte Beta-Zell-Apoptose und den Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse

Zurzeit stehen zwar Medikamente für die Bekämpfung des Diabetes mellitus Typ II zur Verfügung, welche die Diabetes-assoziierten Spätkomplikationen und die Hyperglykämie bekämpfen. Pharmakologische Strategien, welche suffizient den Verlust der funktionellen Beta-Zellmasse aufhalten und somit die Beta-Zellfunktion verbessern, befinden sich mit dem klinischen Einsatz der GLP-1-Agonisten sowie der DDP-IV-Inhibitoren in ihren Anfängen. Die Erforschung weiterer zellulärer Mechanismen und Signalwege, welche Einfluss auf die Abnahme der funktionellen Beta-Zellmasse und somit auf die Beta-Zell-Apoptose nehmen, ist erforderlich, um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten.

Als Ursache für den Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse spielen bestimmte Gene mit Umweltfaktoren zusammen (National Heart Lung and Blood Institute 1998). Studien an eineiigen Zwillingen zeigten eine fast vollständige Konkordanz der Erkrankung und lieferten den Hinweis, dass multiple Gene an der Erkrankung beteiligt sind (Barnett et al. 1981; Elbein 2002). Mit beeinflussenden Umweltfaktoren sind Bewegungsarmut, Ernährung und Adipositas gemeint, die über eine Aktivierung von zellulären Mechanismen einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung der Erkrankung beitragen. In der Literatur werden verschiedene in die Pathogenese involvierte Mechanismen diskutiert.

Im Folgenden soll der Einfluss von Ernährungsfaktoren, dem Immunsystem und proinflammatorischen Zytokinen auf die Steigerung der Apoptoserate dargestellt werden. Abb. 1.1 (vgl. S.7) gibt schematisch die zur Apoptose und konsekutiv zur Abnahme an funktioneller Beta-Zellmasse führenden Zusammenhänge wieder.

Die im Folgenden dargestellten Mechanismen, welche Auswirkungen auf die Entstehung des Diabetes Typ II besitzen, münden alle in einer Steigerung der Apoptoserate der Beta-Zellen.

Adipositas führt zu einer chronischen subklinischen Entzündung, bei der es zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen kommt, welche inflammatorische Signalkaskaden aktivieren. Aus Ergebnissen der letzten Jahre wurde ersichtlich, dass Inflammation über einen längeren Zeitraum sowohl bei Adipositas als auch beim Typ-II-Diabetes eine Rolle spielt (Wellen & Hotamisligil 2005).

Fettleibigkeit führt zum einen zu einem Anstieg an freien Fettsäuren, zum anderen über die Entwicklung einer Insulinresistenz zu einer chronischen Hyperglykämie (Donath et al. 2003). Ein chronisch erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren hat einen direkt toxischen Effekt auf Beta-Zellen (McGarry & Dobbins 1999) und induziert dort ihre Apoptose (Maedler et al. 2001a, 2003, Wrede et al. 2002). Lipotoxizität könnte daher eine wichtige Rolle bei der Zerstörung von Beta-Zellen einnehmen. Die durch Adipositas herbeigeführte Insulinresistenz vermindert die Glukoseaufnahme in die peripheren Zellen und führt somit zu chronischer Hyperglykämie. Es konnte gezeigt werden, dass eine permanent erhöhte Glukosekonzentration die Apoptose sowohl in tierischen als auch in menschlichen Beta-Zellen induzieren kann (Donath et al. 1999; Maedler et al. 2001b; Federici et al. 2001). Für menschliche Inseln konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die angesprochene Glukose-induzierte Apoptose über eine IL-1 β -Produktion von den Beta-Zellen selbst vermittelt wird (Maedler et al. 2002). Darüber hinaus führen die erhöhten Glukosekonzentrationen zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS), die für einen Beta-Zell-Schaden ursächlich sein könnten (Evans et al. 2003; Laybutt et al. 2002). Sowohl IL-1 β als auch die ROS aktivieren den Transkriptionsfaktor NF κ B, was zu einer verätkten Transkription von zahlreichen für die Entzündungsantwort verantwortlichen Mediatoren führt. Der inflammatorische Prozess wird somit generiert.

Auch das Immunsystem wird als ein wichtiger Faktor für die Abnahme der funktionellen Beta-Zellmasse diskutiert. Es existieren Hinweise, dass das angeborene Immunsystem durch Überernährung und genetische Faktoren aktiviert wird (Donath et al. 2003). Makrophagen könnten zu einem erhöhten Serumspiegel an proinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit Diabetes Typ II beitragen (Pickup & Crook 1998). Aber auch dieses angeborene Immunsystem kann, wie in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I, involviert sein. Eine Aktivierung der Akuten Phase beim Diabetes Typ II scheint mit dem Auftreten von Inselzellantikörpern assoziiert zu sein (Pietropaolo et al. 2000).

Als von Ebstein festgestellt wurde, dass hohe Dosen an Natriumsalicylaten zu einer Verbesserung von Glukosurie bei Patienten mit Diabetes mellitus führten, konnte schon 1876 ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und einer entzündlichen Komponente hergestellt werden (Ebstein 1876). Der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen konnte sowohl für die Pathogenese des Diabetes Typ I als auch für den Typ II gezeigt werden und

lässt die beiden Erkrankungen von ihrer Pathophysiologie her weiter zusammen rücken (Donath et al. 2003; Kahn et al. 2006, Hotamisligil, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IFN- γ und TNF- α eine zentrale Rolle in der Zerstörung der Beta-Zellen beim Typ-II-Diabetes einnehmen (Donath et al. 2003; Befunde meiner Arbeitsgruppe). Sowohl Leptin als auch die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α scheinen in die Pathogenese des Typ-II-Diabetes involviert zu sein (Maedler et al. 2004; Donath et al. 2005; Shoelson et al. 2006; Befunde meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Diese Zytokine können zur Induktion von Apoptose in Beta-Zellen führen. Die Manipulation von aktiven inflammatorischen Mediatoren durch den Einsatz von systemisch wirksamen Rezeptor-Antagonisten hatte positive Effekte auf die Beta-Zellen in einem Nagermodell (Maedler et al. 2006). Abb. 1.1 zeigt zusammenfassend die vorgestellten pathophysiologischen Mechanismen, die einen Abfall der funktionellen Beta-Zellmasse bedingen könnten. Die dargestellten Mediatoren besitzen wahrscheinlich auch, abhängig von Konzentration und Einwirkdauer, physiologische Effekte für die Beta-Zellen (Donath et al. 2003).

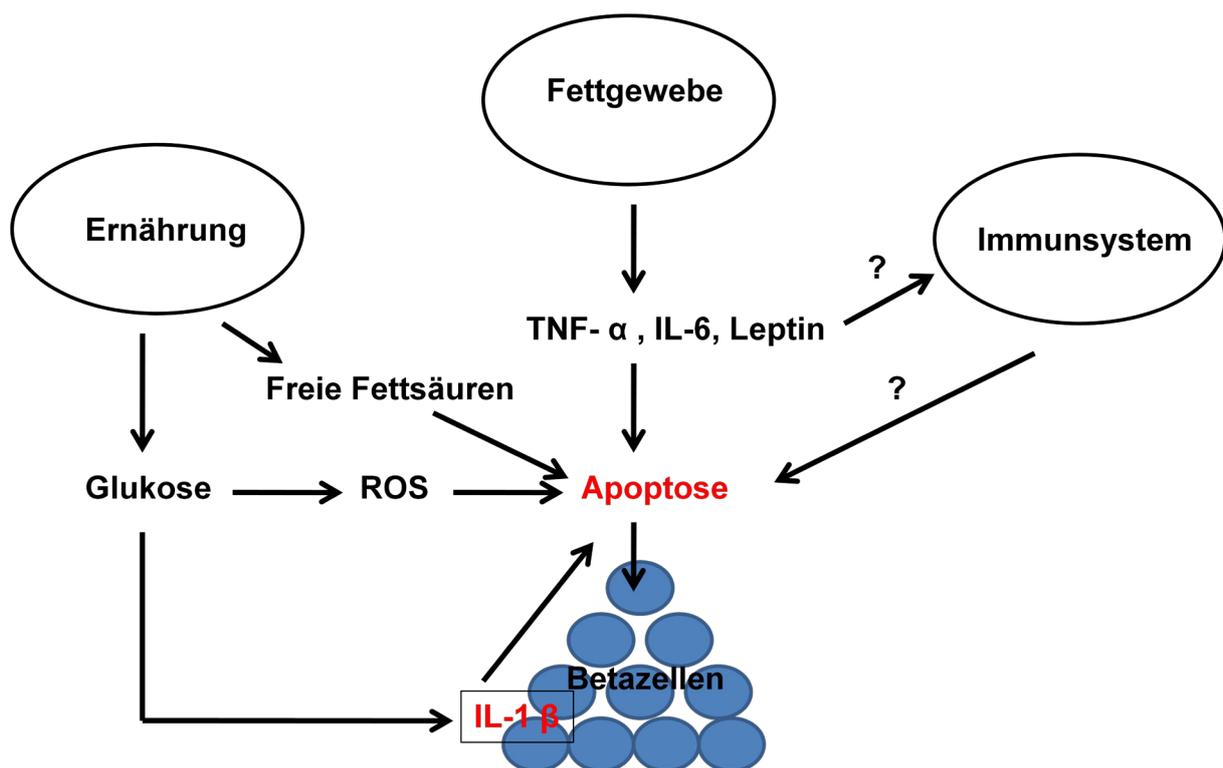


Abb. 1.1: Mediatoren mit Einfluss auf den Abfall der funktionellen Beta-Zellmasse (abgewandelt von Donath et al. 2003, S. 461). Ernährungsfaktoren wie Glukose und freie Fettsäuren haben sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Beta-Zellen. Erhöhte Glukosespiegel induzieren sowohl die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als auch die Produktion von IL-1 β durch die Beta-Zellen. Freie Fettsäuren besitzen einen direkt Beta-Zell-schädigenden Effekt (Lipotoxizität). Zusätzlich bewirkt ein hoher Spiegel an freien Fettsäuren über die Verstärkung von Adipositas die Produktion von Zytokinen durch Adipozyten. Eine zentrale Schlüsselposition nehmen die Zytokine ein. Sie vermitteln zwischen den einzelnen Entzündungskomponenten und sind entscheidend an der Apoptoseinduktion beteiligt.

1.4 Proinflammatorische Zytokine in der Pathogenese des Diabetes Typ II

IL-1 β aktiviert alle drei Hauptgruppen des MAP-Kinase-Wegs, ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), p38 und c-jun N-terminal kinase (JNK) (Larsen et al. 1998; Welsh 1996), welche Schlüsselpositionen in der Signalweiterleitung von Zytokinen einnehmen und in die Regulation der Apoptose involviert sind (Amendrup et al. 2000). Das Zytokin IL-1 β inhibiert die Beta-Zellfunktion und induziert die Apoptose durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Maedler et al. 2001b). Es gibt Hinweise darauf, dass dieses proinflammatorische Zytokin durch den Einfluss chronisch erhöhter Glukosespiegel von humanen Beta-Zellen selbst gebildet wird. Es induziert sowohl in einer Beta-Zelllinie als auch in primären insulinproduzierenden Inseln der Maus die Apoptose (Maedler et al. 2002) und inhibiert die Insulinentranskription (Oetjen et al. 2007). Im Gegensatz dazu konnte keine IL-1 β -Produktion bei gesunden Personen einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Maedler et al. 2002). IL-1 β könnte somit ein interessantes pharmakologisches Ziel für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II darstellen. In einer klinischen Studie wurde die Auswirkung des IL-1 β -Antagonisten Anakinra auf bestimmte Diabetes-assoziierte, laborchemische Messwerte untersucht. Das Ergebnis der Studie ergab, dass HBA1c-Werte im Blut der Patienten gesenkt sowie die Beta-Zellsekretion der mit Anakinra behandelten Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant gesteigert wurden (Larsen et al. 2007). Dahingegen beschreiben Cnop et al. (2005), dass hohe Glukosekonzentrationen keine Produktion von IL-1 β induzieren. Sie postulieren, dass IL-1 β zwar eine wichtige Rolle bei der Beta-Zell-Apoptose durch die Insulinitis beim Typ-I-Diabetes spielt, Zytokine bei der Pathogenese des Typ-II-Diabetes und der resultierenden Apoptose der Beta-Zellen jedoch keine Rolle spielen. In einem in vivo Modell mit humanen pankreatischen Inseln konnten Welsh et al. (2005) ebenfalls keine Steigerung der IL-1 β Konzentration nachweisen. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die genauen Mechanismen der IL-1 β -vermittelten Abnahme der funktionellen Beta-Zellmasse und die Auswirkungen für die Pathogenese des Diabetes Typ II zu verstehen.

Ein weiteres Zytokin, das für die Entwicklung des Diabetes Typ II verantwortlich gemacht wird, ist der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Dieses Zytokin wird im prädiabetischen Zustand sowie bei Adipositas von Adipozyten produziert und ist in der Zirkulation des Körpers in einer erhöhten Konzentration nachweisbar (Shoelson et al. 2006, 2007; Kahn et al. 2006, Hotamisligil et al. 1993; Ploomgard et al. 2007). TNF- α als proinflammatorisches Zytokin aktiviert verschiedene Signaltransduktionskaskaden, bei denen hemmende Effekte auf Insulinwirkungen diskutiert werden (Hotamisligil 2006). Unter anderem zählt hierzu die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs (Andersen et al. 2000). Dieser Einfluss von TNF- α auf den MAP-

Kinase-Weg führt zu einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK. JNK führt konsekutiv sowohl zu einer Hemmung der aktivierenden Tyrosinphosphorylierung am Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) als auch zu einer inhibitorischen Phosphorylierung des IRS-1 am Serin-307 (Hirosumi et al. 2002). Es kommt somit zu einer Hemmung des Insulin-Signals und zu einer letztlich daraus resultierenden Insulinresistenz (Shoelson et al. 2006; Hirosumi et al. 2002; Werner et al. 2004). Darüber hinaus kann TNF- α über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einer Expression von proinflammatorischen Genen führen (Hotamisligil 2005). TNF- α stellt daher eine direkte Verbindung zwischen Fettleibigkeit und Insulinresistenz her. Der Einsatz von TNF- α -Blockern bei Patienten in klinischen Studien lieferte bisher unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf Diabetes-assoziierte Parameter. Bei entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, konnten Gonzales-Gay et al. (2006) sowie Kiortsis et al. (2005) einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität durch den Einsatz von TNF- α -Inhibitoren bei Patienten nachweisen, während Dominguez et al. (2005) keinerlei Effekte auf die Insulinsensitivität feststellen konnten. Klinische Studien dieser Art zielten bislang jedoch nur auf die Erfassung der Insulinresistenz und vernachlässigten die Auswirkungen der TNF- α -Blockade auf die funktionelle Beta-Zellmasse. Der direkte Einfluss von TNF- α auf die Beta-Zelle wird jedoch zurzeit diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen. Es ist nicht ausreichend geklärt, ob TNF- α alleine ausreichend ist, die Beta-Zell-Apoptose auszulösen oder eine Funktionsbeeinträchtigung von Beta-Zellen zu erwirken. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass bestimmte Zytokine an der Zerstörung von Beta-Zellen beteiligt sind (Mandrup-Poulsen 1996; Rabinovitch & Suarez-Pinzon 1998). Bei Behandlung von verschiedenen Beta-Zelllinien mit TNF- α konnte eine Steigerung der Apoptoserate nachgewiesen werden (Ishizuka et al. 1999; Chang I et al. 2003; Parkash et al. 2005; unveröffentlichte Befunde meiner Arbeitsgruppe).

Zusammenfassend geht aus Untersuchungen der letzten Jahre hervor, dass nicht nur ein einzelnes Zytokin im prädiabetischen Zustand vermehrt vorkommt, sondern dass eine Vielzahl von Zytokinen im Organismus freigesetzt wird (Hotamisligil 2006). Auch die Beta-Zelle selbst ist unter bestimmten Bedingungen in der Lage, verschiedene Zytokine zu produzieren (Campbell et al. 1989; Cao et al. 2003; Yang et al. 2005). Die produzierten Zytokine scheinen synergistische Effekte auf die Beta-Zellen auszuüben (Donath et al. 2003; Andersen et al. 2000). Es liegt daher nahe, dass eine Blockade eines einzelnen Zytokins nur eine limitierende Wirkung erzielen kann (Wellen & Hotamisligil 2005; Shoelson et al. 2006). Vielmehr drängt sich als Konzept für die Inhibierung der Zytokinwirkung eine Hemmung eines zentralen Schlüsselproteins auf. Dieses Schlüsselprotein sollte idealerweise an der zentralen Koordination und Verarbeitung der verschiedenen Zytokinsignalkaskaden beteiligt sein. Um

einen pharmakologischen, Beta-Zell-protectiven Ansatz zu entwickeln, muss ein solches Protein für eine zielgerichtete Therapie identifiziert werden.

1.5 JNK als zentrales Protein der Zytokinsignalkaskade

Ein Beispiel für ein zentrales Schlüsselprotein könnte innerhalb des c-Jun N-terminal kinase- (JNK-) Signalwegs beherbergt sein. Viele der im prädiabetischen Zustand verstärkt vorkommenden Zytokine führen zu einer Aktivierung des JNK-Signalwegs und zur Aktivierung der Apoptose (Donath et al. 2003; Shoelson et al. 2006; Hotamisigilil 2006; Bonny et al. 2001). In einer präklinischen Untersuchung konnte durch die zielgerichtete Hemmung von JNK eine Verbesserung der Insulinwirkung erzielt werden (Kaneto et al. 2004; Liu & Rondinone 2005). Die JNK-Signalkaskade kontrolliert u.a. die Expression der Transkriptionsfaktoren c-fos und c-jun und könnte somit Einfluss auf die Beta-Zell-Apoptose nehmen (Ventura et al. 2003). Eine Hemmung des JNK-Signalwegs führte in einer vorherigen Untersuchung zu einer verminderten Expression des mutmaßlich an der Apoptoseregulation beteiligten c-fos (Abdelli et al. 2007). Darüber hinaus konnte in Insulin-produzierenden Zellen gezeigt werden, dass die Inhibition des JNK-Signalwegs fast vollständig vor einer IL-1 β induzierten Apoptose schützt (Abdelli et al. 2007; Ammendrup et al. 2000; Bonny et al. 2000, 2001). Es existieren starke genetische Hinweise darauf, dass der JNK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Diabetes Typ II beim Menschen einnimmt und somit eine Schlüsselposition in der Entstehung der Erkrankung besitzen könnte (Waeber et al. 2000).

1.6 Signaltransduktion der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

JNK gehört neben ERK und p38 zu den drei Hauptgruppen von MAP-Kinasen bei Säugetieren. Bei dem Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg (MAP-Kinase-Weg) handelt es sich um eine Reihe von mehrstufigen Signalkaskaden, welche durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Stress (UV-Licht, Hitzeschock), Wachstumsfaktoren oder Zytokine angeregt werden (Chang L & Karin 2001). Diese Signalkaskaden beeinflussen nahezu alle zellulären Prozesse und regulieren u.a die Embryogenese, die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und den programmierten Zelltod (Chang L & Karin 2001). Prinzipiell umfassen die Signalwege mindestens drei in Serie geschaltete Kinasen, welche nacheinander phosphoryliert werden. Eine MAP3-Kinase phosphoryliert eine MAP2-Kinase, die wiederum eine MAP-Kinase

phosphoryliert (Chang L & Karin 2001). Aktivierte MAP-Kinasen regulieren eine Reihe von zellulären Proteinen, u.a. Transkriptionsfaktoren, die z.B. Entzündungs- oder Apoptosereaktionen hervorrufen (Treisman 1996; Chang L & Karin 2001). Einen Überblick über die vorgestellte Signalkaskade gibt Abb. 1.2. Dieser komplexe Signalweg mit einer Vielzahl von involvierten Proteinen dient der Verarbeitung und Integration extrazellulärer Signale und mündet in einer zellulären Antwort. Um die multiplen extrazellulären Stimuli zu sortieren und Spezifität der Signalverarbeitung zu gewährleisten, sind verschiedene Mechanismen notwendig (Chang L & Karin 2001). Innerhalb der Zelle ordnen Adapterproteine, wie z.B. JIP (JNK-interacting protein) oder POSH (Plenty of SH39), mehrere Enzyme einer Signalkaskade zu einer Einheit, einem Proteinkomplex. Des Weiteren spielen spezifische physikalische Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Proteinen eine Rolle. Die Verteilung von MAP-Kinasen in verschiedenen Zellkompartimenten scheint ebenfalls ein verbreiteter Mechanismus zur Sicherung ihrer Spezifität und Regulation zu sein (Chang L & Karin 2001). Durch Translokation in andere Zellkompartimente erhalten sie Zugang zu spezifischen Substraten und können ihre Funktion ausüben (Merritt et al. 1999; Mata et al. 1996).

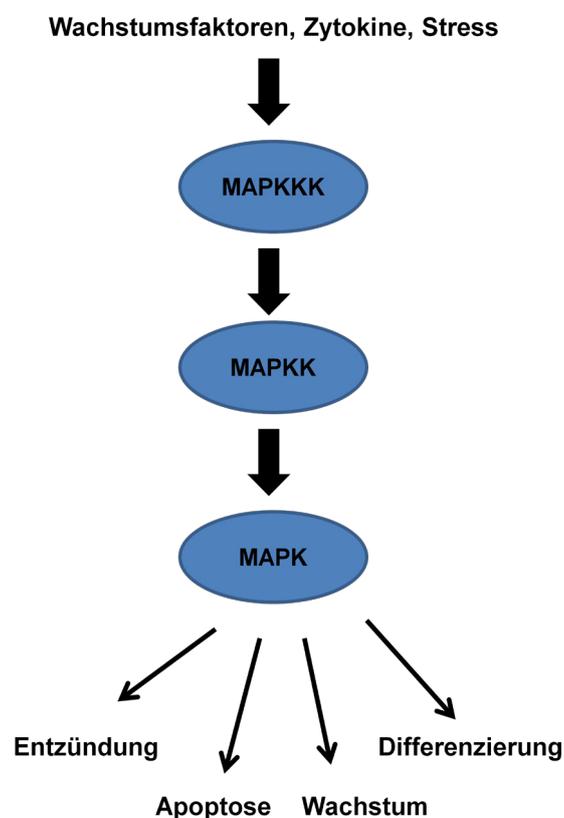


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des MAP-Kinase-Signalweges.

1.7 Die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK)

Im Jahr 1994 wurde von Holzman et al. ein 888 Aminosäure großes Protein, die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK), mit einer apparenten Masse von 130 kDa (rechnerisch 96 kDa) aus einer embryonalen Mäuseniere isoliert. Die DLK gehört zu dem zuvor dargestellten MAP-Kinase-Weg und nimmt dort die Stellung einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase Kinase Kinase (MAP3-Kinase) ein. Hierbei ist sie in die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 involviert (Fan et al. 1996). Die DLK besitzt eine katalytische Domäne zwischen den Aminosäuren 156 und 404, mit der sie als Serin/Threonin-Kinase agiert. Weiterhin besitzt sie zwei Leucin-Zipper, die durch eine kurze Zwischenregion voneinander getrennt sind (AS 421-501) und die die Bildung von Homodimeren gestatten. Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende weist Glycin- und Prolin-reiche Sequenzen auf (Holzman et al. 1994; Hirai et al. 1996). Den schematischen Aufbau der Primärstruktur der DLK kann der Abb. 1.3 entnommen werden.

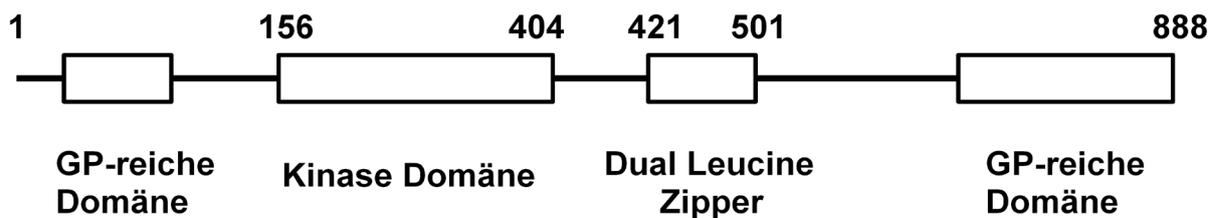


Abb. 1.3 Schema der Primärstruktur der DLK (nach Holzman et al. 1994, S. 30813). GP steht für Glycin und Prolin reiche Domänen innerhalb der DLK

Der Primärstruktur zur Folge gehört die DLK in die Gruppe der Mixed-Lineage Kinasen (MLK) und repräsentiert zusammen mit dem humanen- (Leucine-Zipper Protein (ZPK) (Reddy et al. 1994)), dem Ratten- (Mitogen-Activated Protein Kinase Upstream Kinase (MUK) (Hirai et al. 1996)), dem Drosophila- (Wallenda (Collins et al. 2006)), dem Caenorhabditis elegans-Äquivalent (DAP (Death Associated Protein Kinase) Like Kinase family member (DLK-1) (Nakata et al. 2005)) sowie der strukturell verwandten humanen Leucine-Zipper-Bearing Kinase (LZK/MAP3K13) (Sakumo et al. 1997) eine Subgruppe dieser Proteinfamilie. Viele Autoren fassen die homologen Proteine (MAP3K12) als DLK/MUK/ZPK zusammen. Es konnte gezeigt werden, dass die DLK von verschiedenen Geweben, wie z.B. der Niere, der Lunge, der Leber, den Keratinozyten, aber vor allem von Nervenzellen exprimiert wird (Holzman et al. 1994; Germain et al. 2000). Oetjen et al. (2006) konnten sowohl eine Expression der DLK in der pankreatischen Beta-Zelllinie HIT-T15 als auch in primären Maus-Inseln nachweisen. Die verschiedenen Funktionen der DLK in den unterschiedlichen Geweben sind noch nicht vollständig geklärt. Einige Hinweise auf die DLK-

Funktion konnten jedoch bereits gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass die DLK in Abhängigkeit von ihrer Kinase-Aktivität die Apoptose, sowohl in Neuronen als auch in Beta-Zellen, auslösen kann (Xu et al. 2001; Chen et al. 2008; Plaumann et al. 2008). Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass die DLK die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE- (cAMP response element) abhängige Gentranskription sowie die transkriptionelle Aktivität von CREB (cAMP response element binding protein) und CBP (CREB binding protein) innerhalb der pankreatischen Beta-Zelle hemmt und somit eine wichtige Rolle in der Regulation der Beta-Zellfunktion und der Apoptose einnehmen könnte (Oetjen et al. 2006). Ebenfalls hemmt die DLK die Insulingentranskription (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). In Keratinozyten und Fibroblasten führt die DLK zu einem Wachstumsstopp (Bergeron et al. 1997; Germain et al. 2000). Weiterhin löst die DLK in der Epidermis eine Fragmentierung von DNA aus, ein Prozess der sich gewöhnlich während der terminalen Differenzierung der Keratinozyten vollzieht (Robitaille et al. 2005; Germain et al. 2000). Es existieren ebenfalls Hinweise darauf, dass die DLK an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt ist (Lewcock et al. 2007). Des Weiteren scheint die DLK notwendig für die Migration und Differenzierung von Nervenzellen während der Entwicklung zu sein (Hirai et al. 2002; Hirai et al. 2006). In der Entwicklung scheint die DLK darüber hinaus eine wichtige Funktion für die korrekte Ausbildung von Axonen zu besitzen (Eto et al. 2009). Demgegenüber ist eine Beteiligung der DLK an der Degeneration von Axonen beschrieben worden (Miller et al. 2009). Für das DLK-Homolog in *C.elegans* DLK-1 konnte gezeigt werden, dass sie an der Regeneration von Neuronen und an der Ausbildung von Synapsen beteiligt ist (Hammarlund et al. 2009; Abrams et al. 2008). Ein positiver Effekt des DLK-Homologs Wallenda auf das Auswachsen von Synapsen in *Drosophila* konnte durch Collins et al. (2006) gezeigt werden. Ein Zuviel an DLK im adulten Gehirn führt jedoch zur Neurodegeneration (Chen et al. 2008). Die Tatsache, dass homozygote DLK-Knockout-Mäuse (DLK^{-/-}) perinatal sterben, unterstreicht die äußerst wichtige Rolle der DLK für den Organismus (Hirai et al. 2006).

Innerhalb der Zelle liegt die inaktive DLK an den Adapterproteinen POSH und JIP gebunden vor (Nihalani et al. 2001, 2003; Xu et al. 2005). Die Aktivität der DLK wird zum einen über den Phosphorylierungsgrad und zum anderen durch die Interaktion mit dem Adapterprotein JIP reguliert. Es wird davon ausgegangen, dass Autophosphorylierung der DLK zu einer Aktivierung führt, während Dephosphorylierung, z.B. durch Calcineurin, innerhalb der pankreatischen Beta-Zelle eine Hemmung der DLK herbeiführen könnte (Nihalani et al. 2003; Plaumann et al. 2008). Eine Tyrosinphosphorylierung von JIP durch die Familie der SRC-Kinasen führt zu einer Steigerung der Affinität zwischen DLK und JIP und somit zu einem Aufrechterhalten des JNK-JIP-DLK-Moduls in einem inaktiven Zustand (Nihalani et al. 2007). Die Phosphorylierung von JIP am Threonin-103 durch JNK führt hingegen zur Disso-

ziation der im inaktiven Zustand an JIP gebundenen DLK von ihrem Adapterprotein ins Zytosol, wo diese durch Autophosphorylierung aktiviert wird und über eine Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen MKK7 bzw. MKK4 die MAP-Kinase JNK aktiviert (Nihalani et al. 2001, 2003, 2007). Bei dem Prozess der Autophosphorylierung ist die Aminosäure Lysin 185 von besonderem Interesse. Die an dieser Position stattfindende, für die katalytische Funktion essentielle Bindung von ATP kann durch einen Austausch der Aminosäure Lysin zu Alanin verhindert werden. Es resultiert die katalytisch inaktive Mutante DLK K185A (Mata et al. 1996). Ein weiterer Mechanismus der zur Regulation der DLK beitragen könnte, wurde für die DLK und ihre Homologe Wallenda (aus *Drosophila*) und DLK-1 (aus dem Wurm *C.elegans*) gezeigt. Die Regulation erfolgt dabei durch eine E3-Ubiquitin-Ligase (PHR-1, CHIP (HSC70-interacting protein), RPM-1 bzw. Highwire), die Ubiquitinreste an das entsprechende DLK-Homolog ligiert. Es kommt folglich zu einer Degradation der Proteine im Proteasom und somit zu einer Herunterregulierung des Signalwegs (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Daviau et al. 2006, Lewcock et al. 2007). Vermutlich wird die Degradationsrate der DLK-1 durch den Grad ihrer Aktivität getriggert (Abrams et al. 2008).

1.8 Einfluss der DLK auf CREB und das Überleben der Beta-Zelle

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die DLK einen hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor CREB ausübt und dass dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Beta-Zellfunktion und Beta-Zellmasse besitzt (Reddy et al. 1999; Oetjen et al. 2003a, 2003b, 2006; Jambal et al. 2003; Jhala et al. 2003). CREB aktiviert in den insulinproduzierenden Zellen durch Bindung an den humanen Insulingenpromotor die stimulierte Insulingentranskription und führt darüber hinaus zu einem vermehrten Beta-Zellüberleben sowie zu einer verminderten Apoptoserate (Jhala et al. 2003; Oetjen et al. 1994, 2003a, 2003b). Die DLK hemmt sowohl die durch Glukose als auch die durch Membrandepolarisation stimulierte transkriptionelle Aktivität von CREB (Oetjen et al 2006). Für den Transkriptionsfaktor CREB konnte gezeigt werden, dass er in eine Reihe von physiologischen Prozessen, wie z.B. bestimmte Lernprozesse, das Zell-Überleben oder die T-Zell Aktivierung involviert ist (Barton et al. 1996; Mayr & Montminy 2001). Desweiteren ist CREB an der Regulation der Anti-Apoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-xl sowie an dem für das Beta-Zellüberleben wichtigen IRS-2 beteiligt (Jhala et al. 2003; Eliseev et al. 2004) Die Bedeutung von CREB für die Beta-Zelle zeigte sich durch den Einsatz eines Tiermodells. Transgene Mäuse mit einer beta-zellspezifischen dominant-negativen CREB-Mutante entwickeln einen Diabetes mellitus durch eine gesteigerte Rate an Apoptose der insulinproduzie-

renden Zellen. Diese Mäuse versterben ca. drei Wochen postnatal (Jhala et al. 2003; Rudolph et al. 1998).

1.9 Kompartimentierung und nukleozytoplasmatischer Transport von Proteinen

Um eine akkurate Zellfunktion zu gewährleisten, ist die Regulation und Koordination von Proteinen innerhalb der Zelle von großer Bedeutung (Chuderland et al. 2008). Dieser Prozess spielt eine besondere Rolle für verschiedene Proteine von Signalkaskaden, die eine schnelle und dynamische Änderung ihrer Lokalisation in Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli vollziehen. Die Verteilung von Kinasen des Mitogen-aktivierten Proteinkinase-wegs in verschiedenen Kompartimenten der Zelle scheint ein wichtiger Mechanismus für die Erlangung ihrer Spezifität zu sein (Mochly-Rosen 1995; Mata et al. 1996). Für verschiedene Proteinkinasen konnte gezeigt werden, dass sie stimulus-abhängig ihre Lokalisation innerhalb der Zelle ändern, an spezifische Ankerproteine binden, Zugang zu ihrem physiologischen Substrat erhalten und ihre physiologische Funktion ausüben (Mata et al. 1996). Für MAP-Kinasen, die als Effektor-Kinasen des MAP-Kinase-Wegs agieren, ist seit längerem bekannt, dass sie durch Translokation Zugang zum Kern erlangen können, um auf diese Weise in die Regulation der Transkription eingreifen zu können (Inagaki et al. 1994; Chang L & Karin 2001). In der letzten Zeit gibt es jedoch vermehrt Berichte darüber, dass auch MAP3-Kinasen in den Kern translozieren können (Merritt et al. 1999; Fanger et al. 1997; See et al. 2001).

Das zentrale Merkmal eukaryotischen Lebens ist die Ausbildung eines Zellkerns (Nukleus), der die gesamte genomische DNA des Organismus beherbergt und vom Zytoplasma durch eine Doppellipidmembran abgegrenzt ist. Durch diese Kompartimentierung innerhalb der Zelle wird eine selektive Kontrolle der Transkription erreicht. Diese Transkriptionskontrolle wird sowohl durch intrazelluläre, veränderte Stoffwechselprozesse als auch durch extrazelluläre Stimuli und nachfolgender Aktivierung von bestimmten Signalkaskaden reguliert (Chuderland et al. 2008). Darüber hinaus erhält die eukaryotische DNA durch die Kompartimentierung höhere Stabilität gegenüber zytoplasmatischen Stoffwechselfvorgängen. Während die Kernhülle den ungerichteten Zugang zum Kern von diversen Molekülen unterbindet, erlaubt sie den Transport von bestimmten Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen. Zu diesem Zweck sind in die Kernmembran Proteinkomplexe eingelagert, die als Poren (nuclear pore complex NPC) dienen. Der Transport von Proteinen in den Kern ist ein sehr entscheidender Schritt für die Aufrechterhaltung des Lebens. Um diesen Shuttle von bestimmten Molekülen zu gewährleisten, haben sich im Laufe der Evolution ver-

schiedene Transportwege entwickelt. Gemeinsam ist allen beteiligten Transportsubstraten, dass sie ein bestimmtes Signal für den aktiven Kerntransport aufweisen.

Um die Kernmembran zu überwinden und Zugang zum Nukleus zu erlangen, benötigen Proteine, die größer als 45 kDa sind, eine Kernerkennungssequenz (nuclear localization signal NLS) innerhalb ihrer Proteinsequenz, die die Selektivität dieses Transportes gewährleistet (Bonner 1975; Paine et al. 1975; Taniguchi et al. 2002). Kleinere Proteine und Ionen gelangen demgegenüber durch passive Diffusion über die Kernporen (NPC) in den Kern. Bei einer NLS handelt es sich um eine kurze Peptidsequenz mit einem hohen Anteil von basischen Aminosäuren, welche durch Bindung an Transportproteine (Importin- α / β) den Import von Proteinen in den Kern ermöglicht (Tran & Went 2006). Der Kernimport ist in zwei funktionelle Schritte unterteilt (Newmeyer & Forbes 1988, Richardson et al. 1988). Importin- α dient dabei zuerst der Erkennung der Kernerkennungssequenz, während Importin- β nach erfolgreicher Erkennung die Translokation des Proteins durch die Kernpore vermittelt (Lange et al. 2007). Die Energie für den Kerntransport wird durch das Energieäquivalent GTP und die GTPase Ran bereitgestellt (Quimby & Dasso 2003; Melchior et al. 1993). Dieser Mechanismus erlaubt die schnelle Stimulus-abhängige Translokation von Signalproteinen in den Kern. Abb. 1.4 zeigt den beschriebenen Ablauf des Kerntransportes schematisch.

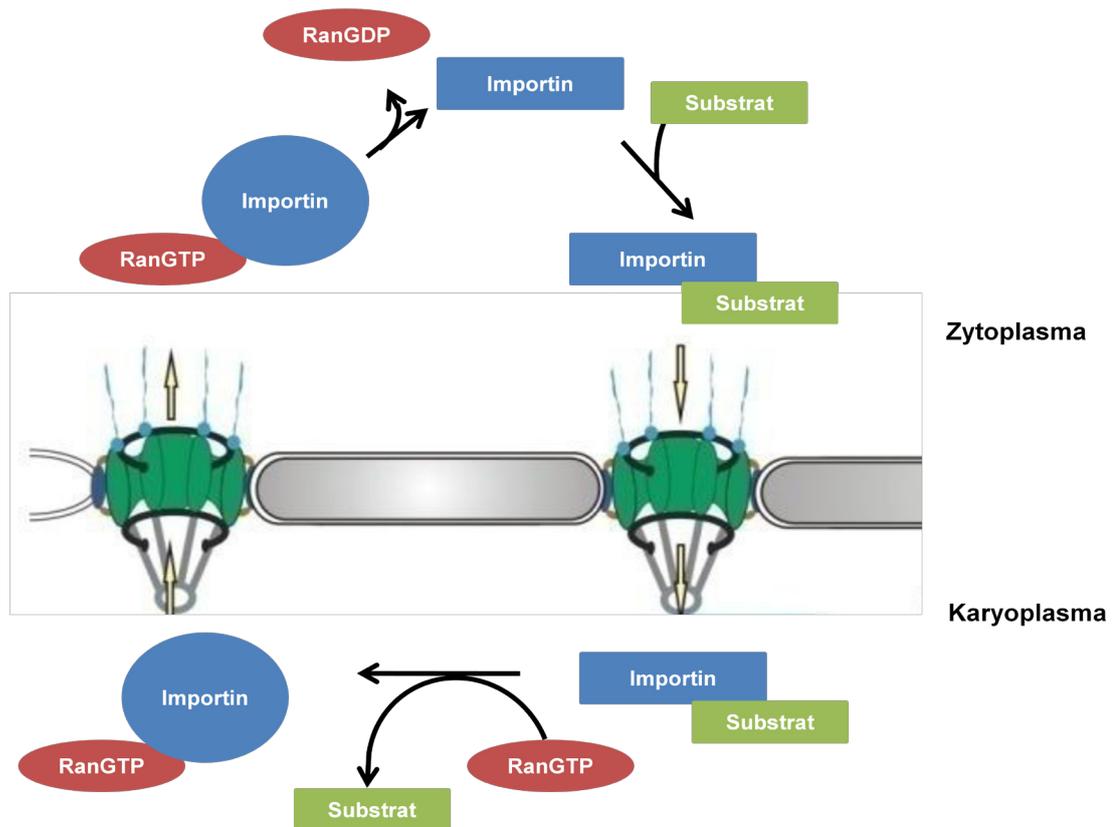


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Kernimportes über die Kernmembran (abgewandelt von Karlsons Biochemie, 15. Auflage, Doenecke et al. 2005, S. 375). Der Kernimport beginnt mit der spezifischen Erkennung des Substrates durch das Importin. Der gebildete Importkomplex tritt anschließend durch die Kernpore in den Nukleus ein. An der Kernmembran dissoziiert der Komplex durch Bindung von RanGTP an das Importin. Das Substrat wird auf diese Weise in den Kern entlassen. Im RanGTP-gebundenen Zustand kehrt das Importin in das Zytoplasma zurück. Dort hydrolysiert die GTPase Ran das gebundene GTP zu GDP, das Importin löst sich von RanGDP und steht für den neu beginnenden Importzyklus zur Verfügung.

Es existieren zwei klassische Arten von Kernerkenntnissequenzen. Die erste NLS-Klasse wurde erstmalig im großen T-Antigen des SV-40 (PKKKRKV) beschrieben und besteht aus einer Region von vier bis acht basischen Aminosäuren (Kalderon et al. 1984a, 1984b; Lanford et al. 1986). Die zweite Klasse, bekannt als zweiteilige Kernerkenntnissequenz (Bipartite NLS), welche erstmalig im Nukleoplasmin identifiziert wurde (KRPAATKKAGQAKKKLDK), besteht aus zwei basischen Aminosäureclustern, welche durch eine Zwischenregion von 7 bis 12 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Hierbei stehen zwei basische Aminosäuren zu Beginn der Sequenz. Am Ende des zweiteiligen NLS-Motivs sind drei von fünf Aminosäuren basisch (Dingwall & Laskey 1991). 56 Prozent aller Kernproteine besitzen eine zweiteilige Kernerkenntnissequenz, während diese Sequenz bei Proteinen, welche nicht im Kern lokalisiert sind, nur zu 4,2 Prozent vorkommt (Robbins et al. 1991). Tragen Proteine eine zweiteilige Kernerkenntnissequenz und sind nicht im Kern lokalisiert, so sind sie häufig in anderen Organellen vorzufinden (Robbins et al. 1991).

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Proteine, die größer sind als 45 kDa, nicht in der Lage sind, die Kernmembran mittels passiver Diffusion zu überwinden. Für die DLK ist bekannt, dass sie eine apparente Masse von 130 kDa besitzt und dass sie Einfluss auf bestimmte Kernproteine wie CREB, CBP und CRE ausübt. Darüber hinaus konnte für diese MAP3-Kinase gezeigt werden, dass sie in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert zu sein scheint: Für die DLK konnte in verschiedenen Zelllinien eine intrazelluläre Verteilung im Zytosol, an der Plasmamembran-gebunden sowie am Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Mata et al. 1996; Merritt et al. 1999; Hébert et al. 2000; Douziech et al. 1999). Es existieren ebenfalls Hinweise dafür, dass die DLK bzw. ihr humanes Homolog, die ZPK, im Kern lokalisiert vorkommen können (Merritt et al. 1999; Hébert et al. 2000; Reddy et al. 1999).

1.10 Fragestellung

Aufgrund der Tatsache, dass die DLK in HIT-Zellen durch TNF- α aktiviert werden kann, zudem zu den Aktivatoren von JNK gehört und einen hemmenden Einfluss auf CREB besitzt, lässt sich die Vermutung äußern, dass sie eine Schlüsselposition in der Zytokin-vermittelten Zerstörung der funktionellen Beta-Zellmasse einnehmen könnte (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Genauere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses Proteins sind für die Bestätigung dieser Vermutung notwendig. Da in vorherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die DLK sowohl CREB als auch CBP in ihrer transkriptionellen Aktivität hemmt und somit Einfluss auf bestimmte Kernproteine besitzt, stellt sich die Frage, wo die DLK lokalisiert ist und ob sie die Möglichkeit hat, unter gewissen Bedingungen in den Kern zu gelangen. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Aspekte innerhalb der insulinproduzierenden Beta-Zelllinie HIT-T15 analysiert werden: Zum einen soll die Frage nach der subzellulären Lokalisation der DLK geklärt werden. Zum anderen soll untersucht werden, ob die Verteilung der DLK innerhalb der Zelle reguliert ist und ob die DLK verschiedene Funktionen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation ausübt. Dabei sollten im Hinblick auf die Pathogenese des Diabetes Typ II vor allem die Auswirkungen auf Beta-Zell-protective Faktoren sowie auf den Mechanismus der Beta-Zell-Apoptose untersucht werden. Dieser Ansatz könnte dem besseren Verständnis der DLK vermittelten, zytokin-induzierten Zerstörung der Beta-Zellmasse dienen und somit zur Aufklärung eines in die Pathogenese des Diabetes Typ II involvierten Mechanismus beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien

10-cm-Agar-Platte	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
15-ml- / 50-ml-Plastikröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
6-well-Platte	Nunc, Roskilde, Denmark
96-well-Mikrotitierplatte (flacher Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-well-Mikrotitierplatte (runder Boden)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dialyseschläuche	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Deckplättchen (Thermanox Plastik, 2,5 cm)	Nunc, Roskilde, Denmark
GeneRuler™ 1 kb / 100 bp	Fermentas, Burlington, Kanada
Reaktionsgefäße (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kanülen (20 G / 27 G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Kunststoffküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran (Hybond-HCL)	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Parafilm	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl / 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm (Hyperfilm™-ECL)	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spritzen (1 ml / 5 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen Quick-Seal	Beckman, München
Whatmanpapier	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Zellkulturschalen 6 cm / 15 cm	Schuetz24, Göttingen, Deutschland

2. Material und Methoden

Geräte

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumplatte (80 x 70 mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav (Bioclav)	Schütt, Göttingen, Deutschland
Bakterieninkubator 37°C	Heraeus Sepatech, Langenselbold, Deutschland
Diamantmesser	Schmied-Labortechnik, Bielefeld, Deutschland
Elektrophoresekammer (SE 250)	Hoefer, San Francisco, USA
Fluorometer Fusion	Packard, Dreieich, Deutschland
Gelkammer (für Agarosegele)	IBI, New Heaven, USA
Glasplatte (80 X 70 mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Horizontalelektrophoresekammer	IBI, New Heaven, USA
Inkubator (Stericult 200)	Labotect, Göttingen, Deutschland
Kunststoffkamm (1,5 mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Luminometer (Auto-Lumat LB 953)	E & G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	Schütt, Göttingen, Deutschland
Mikroskop (invers, TMS)	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle	Philips, Hamburg, Deutschland
PCR cycler T-Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Schütt, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfen (Pipetman)	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Pipettierhilfen (Pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Platzhalter (1,5 mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Quarzküvetten (1 cm)	Hellma, München, Deutschland
Reichert-Jung Ultracut E	Leica, Bensheim, Deutschland
Rocky (mini rocking platform)	Biometra, München, Deutschland
Rocky (rocking platform)	Biometra, München, Deutschland
Roling platform TRM-V - IDL	Nidderau, Deutschland
Röntgenkassette	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Scanner (hp psc 1315)	Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland

2. Material und Methoden

Schüttelinkubator (Innova 4300)	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Schüttelinkubator (Ceromat HK)	Krannich, Göttingen, Deutschland
Spannungsgerät (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen, Deutschland
SpeedVav (Hetovac)	Heto, Allerød, Dänemark
Sterile Werkbank (Lamin Air HB 2448)	Hereus Instruments, Hanau, Deutschland
Thermomixer (5436) und (Compact)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferkammer	Wissenschaftliche Werkstätten, Universität Göttingen, Deutschland
Transilluminator Biometra Ti1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop LEO906E	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 10	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Ultrazentrifuge (Beckman Ultrazentrifuge L5-65)	Beckman, München, Deutschland
Ultrazentrifugen-Rotor (Beckman 70,1 Ti-Rotor)	Beckman, München, Deutschland
UV-Spektralphotometer (UV-160)	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Versiegelungsapparat (Beckman tube sealer)	Beckman, München, Deutschland
Videokamera mit Videoprinter (Geldokumentation E.A.S.Y)	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Vortexer (VortexGenie2)	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbäder	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zentrifuge (Beckman Centrifuge GS-6)	Beckman, München, Deutschland
Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2HS)	Beckman, München, Deutschland
Zentrifuge (L8-70M Ultracentrifuge)	Beckman, München, Deutschland
Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen-Rotor (Beckman JA-14 Rotor)	Beckman, München, Deutschland
Zentrifugen-Rotor (Beckman JA-20 Rotor)	Beckman, München, Deutschland

2.2. Chemische und biologische Materialien

2.2.1 Chemikalien

Aceton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Adenosinriphosphat (ATP)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agar	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Agarose ultrapur	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA) (pH 7,0)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Anisomycin	Sigma, St.-Louis, USA
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Adenosin Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Azur II (1 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Benzil	Polyscience Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Bis-acrylamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bleicitrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Borax $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl_2	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cäsiumchlorid (CsCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DEAE-Dextran	GE Healthcare. Buckinghamshire, UK
Deoxynukleosidtriphosphat	Roche, Mannheim, Deutschland
Digitonin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EGTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Entwicklerlösung	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Ethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Fixierlösung	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd (25 %)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin (87 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycyglycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glukose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl (37 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hepes	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O (RNase frei, ad injectabilia)	Braun, Melsungen, Deutschland
Interleukin-1 β	Biomol, Hamburg, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
K ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LR-Gold	Polyscience Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Luciferin	Sigma Adrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
METAFFECTENE [®]	Biontex, München, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natrium-borohydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Nonidet-P40	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenol	Biomol, Hamburg, Deutschland
Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pepton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pferdeserum (Horse Serum)	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sephadex G 50	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Sepharose CL-4B	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
SP600125 JNK-Inhibitor	Biomol, Hamburg, Detschland
TEMED	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tri-Natrium-Citrat-dihydrat x 2 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetrachlorgoldsäure H ₂ AuCl ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin /EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20 / 80	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.2.2 Antibiotika

Ampicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 μ g/ml) - Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2. Material und Methoden

2.2.3 Kits

Big Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bradford Dye Reagent for Protein Assays	Bio-Rad, München, Deutschland
Easy Pure [®] DNA Purification	Biozym, Hess. Oldendorf
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Vectashield [®] Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.2.4 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind im Folgenden aufgelistet. Sie wurden für unterschiedliche Experimente verwendet. Die entsprechenden Verdünnungen sind den Beschreibungen der einzelnen Methoden zu entnehmen.

Name	Spezies	Verwendung	Herkunft
Primäre Antikörper			
DLK-Antikörper (223 C-terminalen AS)	Kaninchen	EM 1:50	Holzman et al. 1994
		IF 1:50	Fan et al. 1996
		WB 1:3500	
Anti-Flag [®] M2 Monoclonal Antibody	Maus	EM 1:100 IF 1:200	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cleaved Caspase-3 (Asp 175) Antikörper	Kaninchen	IF 1:50	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
GAPDH-Antikörper	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
SAPK/JNK Antikörper	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-SAPK/JNK Antikörper	Maus	WB 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor [®] 488-labeled Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Ziege	IF 1:50	Molecular Probes, Eugene, USA

2. Material und Methoden

Tetramethylrhodamine (TRITC)-labeled Goat Anti-Mouse IgG Antibody	Ziege	IF 1:200	Molecular Probes, Eugene, USA
Peroxidase-labeled Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Ziege	WB 1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Peroxidase-labeled Goat Anti-Mouse IgG Antibody	Ziege	WB 1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

2.2.5 Expressionsvektoren

Expressionsvektoren sind speziell konstruierte Klonierungsvektoren, die nach Einbringen in eine Zelle die Transkription und Translation des in den Vektor klonierten Gens erlauben. Der Expressionsvektor **pFlag-DLK wt (pDLKwt)** besitzt zwischen den Restriktionsschnittstellen für HindIII und EcoRI die genetische Information für die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase. Die Transkription steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Die DLK-cDNA umfasst 3401 bp und wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) (siehe Abb. 2.1) subkloniert. Es wurde zusätzlich ein N-terminales FLAG-Epitop, welches aus acht Aminosäuren besteht, hinzugefügt (Holzman et al. 1994). Während des Arbeitens mit dem Plasmid ist festgestellt worden, dass die Restriktionsschnittstelle EcoRI verloren gegangen ist. Durch Einführung einer Punktmutation im katalytischen Zentrum der DLK an Position 185 (AS K185A) entstand das Plasmid **pFLAG-DLK K185A**. Das neu entstandene Enzym kann kein ATP mehr binden und ist somit nicht mehr katalytisch aktiv (Mata et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasmid pFLAG-DLK wt durch Punktmutationen dermaßen verändert, dass die drei weiteren Plasmide **pFLAG-DLK NLS1**, **pFLAG-DLK NLS2** und **pFLAG-DLK Doppel** entstanden (siehe Kap. 2.4.1 Zielgerichtete Mutagenese). **pBluescript (pBS)** enthält keine relevante genetische Information und wurde zum Ausgleich transfizierter DNA-Mengen bei Transfektionen sowie zur Kontrolle in den immunzyto-chemischen Experimenten eingesetzt.

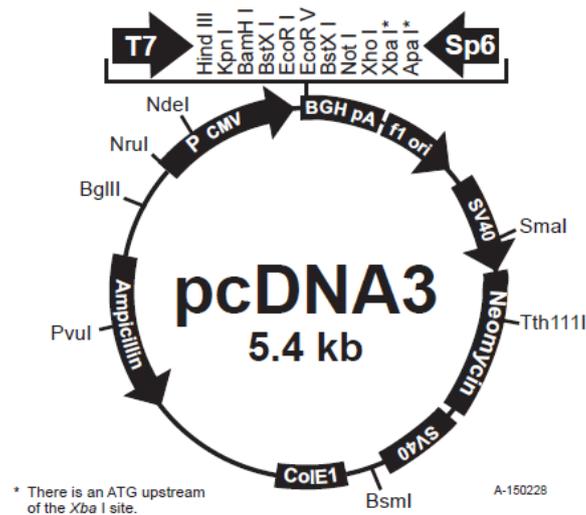


Abb. 2.1: Expressionsvektor pcDNA3. Die DLK sowie deren Mutanten wurden zwischen die Restriktionschnittstellen HindIII und EcoRI kloniert (Skizze übernommen von Invitrogen GmbH: <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pcdna3.pdf>).

Alle folgenden Konstrukte waren in den Expressionsvektor pSG424 (Sadowski & Ptashne 1989) subkloniert und wurden für Reporteragenassays verwendet. Hierbei kamen die Expressionskonstrukte **Gal4-CREBfl**, **Gal4-CREB-TAD (pZ1)** und **GAL4-CBPfl** zum Einsatz (Oetjen et al. 2005).

2.2.6 Reporteragenplasmide

Reporteragenplasmide enthalten neben einem Promotor die genetische Information für einen Reporter: Ein Protein, welches sich leicht nachweisen lässt. Es kamen im Folgenden zwei unterschiedliche Reporter zum Einsatz. Zum einen die Luciferase, die der Analyse der Promotoraktivierung diene. Hierzu wurden die Konstrukte **4xSomCRE-Luc** (Oetjen et al. 1994) und **pG5E1BLuc** (Oetjen et al. 2006) eingesetzt (zum schematischen Aufbau siehe Abb. 2.2). Zum anderen kam die GFP-Mutante topaz gold (GFPTpz) unter der Kontrolle des CMV-Promotors zum Einsatz und diene der Kontrolle der Transfektionseffizienz (siehe Kap. 2.8.3, S. 65 GFPTpz-Messung).

2. Material und Methoden

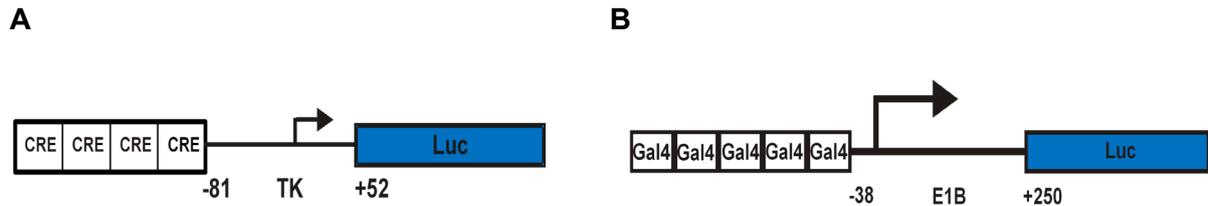


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Reporter Gene. **A:** 4xSomCRE-Luc: enthält vier Wiederholungen des CRE des Ratten Somatostatingenpromotors sowie den minimalen Thymidin Kinase Promotor des Herpes simplex Virus. **B** G5E1B besteht aus 5 Wiederholungen einer Bindungsdomäne für den Hefetranskriptionsfaktor GAL4 5' des minimalen Promotors des E1B Adenovirus.

2.2.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für Klonierungs- und Sequenzierungsreaktionen wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.1: Oligonukleotide. Restriktionsenzymststellen für XbaI und EcoRI sind unterstrichen, mutierte Basentriplets innerhalb der Oligonukleotide sind hervorgehoben dargestellt.

Name	Richtung	Sequenz in 5'-3' Richtung
DLK 5' XbaI	For	CATCTAGAGTTCGAGCTGATGAGG
DLK 3' K186/R188 für DLK NLS 1	Rev	CCTTGAGATCTGCAACCGCCTTCAC
DLK 5' K186/R188AI für DLK NLS 1	For	GTGAAGGCGGTTGCAGATCTCAAGG
DLK 3' EcoRI	Rev	GCGCAGAATTCCATAAGGATGCAG
DLK 3' K196/R199/K	Rev	CAGCGCTGCAAGATGCGCGATG
DLK 5' K196/200/R1	For	CATCGCGCATCTTGCAGCGCT
DLK 5' 196/199/200	For	CTGACATCGCGCATCTTGCAGCGCTGAAGC
DLK 3' 196/199/200	Rev	GCTTCAGCGCTGCAAGATGCGCGATGTCAG
DLK 5' NLS_trip1 für DLK NLS 2	For	CTGACATCGCGCATCTTGCAGCGCTGAAGCACCCCAAC
DLK 3' NLS_trip1 für DLK NLS 2	Rev	GCTTCAGCGCTGCAAGATGCGCGATGTCAGTCTCC

2.2.8 Bakterienstämme

Der apathogene Ampicillin-sensible E.coli-Stamm DH-5 α , welcher für die Plasmid-amplifikation verwendet wurde, wurde zum Erlangen der Transformationskompetenz in der logarithmischen Wachstumsphase mit eiskalter Calciumchlorid-Lösung behandelt. Auf diese Weise wurde der E. coli-Stamm zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt (Dagert & Ehrlich 1979). Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in einer CaCl₂-Lösung mit 15% (v/v) Glycerin bei -80°C in flüssigem Stickstoff. Es erfolgte eine Portionierung zu jeweils 100 μ l. Zum Kultivieren von transformierten Bakterien wurden LB-Agarplatten verwendet (siehe Kap. 2.2.9). Die LB-Agarplatten wurden mit 1,5 % (w/v) Agar versetztem LB-Medium hergestellt. Hierzu wurde die Suspension autoklaviert und anschließend auf 50°C abgekühlt. Im Anschluss wurde Ampicillin (50 μ g/ml) hinzugegeben, die Suspension auf 10 cm-Schalen verteilt und bei 4°C gelagert.

LB-Medium

Pepton	1 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
gelöst in H ₂ O dest.	

2.2.9 Transformation kompetenter E.coli

Transformation bezeichnet die Aufnahme von DNA durch eine permeabilisierte Zellmembran. Die kompetenten E.coli wurden auf Eis aufgetaut, 100 ng Plasmid DNA wurden hinzupipettiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Kompetenz der Bakterien wurde im Thermomixer bei 42°C für 30 Sekunden ein Hitzeschock durchgeführt. Im Anschluss folgte eine Lagerung auf Eis für 2 min, eine Zugabe von 400 μ l LB-Medium und anschließend eine Inkubation für 1 h bei 37°C im Thermomixer. Hiernach wurden 200 μ l der Bakterien auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C in einem Inkubator über Nacht inkubiert. Das transformierte Plasmid enthielt ein Resistenzgen gegen Ampicillin. So konnte durch den Zusatz vom entsprechenden Antibiotikum zu der LB Agarplatte eine Selektion von erfolgreich transformierten, Plasmid tragenden Bakterien erzielt werden.

2.3 Zellkultur

Das Arbeiten mit der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Laminarluft unter einer sterilen Werkbank (Labotec, Göttingen). Alle Lösungen und Medien wurden autoklaviert, bzw. bei Hitzeelastilität steril filtriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor dem Arbeiten wurden eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt, die Medien auf 37°C im Wasserbad erwärmt und alle Materialien mit 70 %igem Isopropanol abgewischt.

2.3.1 Zelllinie HIT-T15

Bei der Zelllinie HIT-T15 handelt es sich um eine insulinproduzierende pankreatische Beta-Zelllinie, welche durch Transformation von Beta-Zellen des syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) mit dem Simian-Virus 40 hergestellt wurde (Santerre et al. 1981). Diese Zelllinie weist eine Reihe von physiologischen Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes auf und ist elektrisch erregbar. Durch Depolarisation kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Dihydropyridin-sensitiver L-Typ-Calcium Kanäle und konsekutiv zu einem Ca^{2+} -Einstrom. Ein weiterer entscheidender Aktivierungsweg der HIT-T15 Zelllinie läuft über den sekundären Botenstoff cAMP (Keahey et al. 1989, Schwaninger et al. 1993a, 1993b, Oetjen et al. 1994, 2003b, 2005 und 2006). Hierbei wird ein G-Protein gekoppelter Rezeptor durch einen Stimulus aktiviert und die Adenylatzyklase wird stimuliert. Es kommt zu einer Katalyse von ATP zu cAMP. Als sekundärer Botenstoff führt cAMP zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, welche verschiedene zelluläre Proteine phosphoryliert, darunter auch den Transkriptionsfaktor CREB. Phosphoryliertes CREB führt konsekutiv zur Transkription von cAMP-induzierbaren Genen. HIT-T15 Zellen wurden für transiente Transfektionen, Immuncytochemie und Elektronenmikroskopie verwendet.

2.3.2 Kultivierung

Die HIT-T15-Zellen wuchsen adhärent als Monolayer auf 15 cm Zellkulturschalen. Bei einer konfluent bewachsenen 15 cm Zellkulturschale konnte man eine Zellzahl von 30×10^6 annehmen. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 im Inkubator (Stericult 200, Labotect, Göttingen). Das regelhafte Wachsen der Zellen wurde regelmäßig unter einem inversen Mikroskop kontrolliert.

2. Material und Methoden

Die Passagierzeit der HIT-T15-Zellen betrug, bedingt durch Wachstumsgeschwindigkeit und wöchentliches Splitten im Verhältnis von 1:4, eine Woche. Drei bis vier Tage nach dem Splitten erfolgte ein Mediumwechsel. Hierbei wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und vorsichtig vorgewärmtes Komplettmedium an den Rand der Zellkulturschale pipettiert. Voll bewachsene Schalen wurden für die entsprechenden Experimente ausplattiert oder wiederum gesplittet und somit weiter kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen nach Splitten oder Mediumwechsel 48 h inkubiert wurden, bevor sie für Experimente geerntet wurden. Die absolute Zahl der Splitvorgänge definiert die Passagezahl der HIT-T15-Zellen. Das Alter der Zellen betrug zwischen 30 und 60 Passagen.

Beim Splitten wurde das Medium, Trypsin und PBS im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt und das Medium einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale zunächst abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, welches vorsichtig an den Rand der Zellkulturschale pipettiert wurde. Nach vorsichtigem Schwenken der Schale wurde das PBS abgesaugt und 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, um die adhären wachsenden Zellen vom Plastikboden zu lösen. Es folgte eine Inkubation im Inkubator bei 37°C für 5 min. Durch kräftiges Beklopfen der Schale nach der Inkubation wurde das Lösen der Zellen unterstützt. Es folgte die Inaktivierung der Trypsin-Wirkung durch Hinzugabe von 10 ml Komplettmedium mittels einer Glaspipette. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen komplett abgelöst und in einem 50 ml Falcon Plastikröhrchen gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen mit 1300 UpM für 2 min bei RT. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 10 ml Komplettmedium resuspendiert und es wurde erneut bei 1300 Upm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Pellet mit 20 ml Komplettmedium resuspendiert. Parallel wurden 25 ml vorgewärmtes Komplettmedium auf neue 15-cm Zellkulturschalen gegeben, auf die im Anschluss 5 ml der Zellsuspension gleichmäßig verteilt wurden. Die Schale wurde leicht geschwenkt, um die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Schale zu fördern. Anschließend wurden die Zellen im Inkubator aufbewahrt.

Puffer und Lösungen

PBS

NaCl	140 mM
KCl	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

gelöst in H₂O bidest.

mit NaOH auf pH 7,4 titriert, Autoklaviert

2. Material und Methoden

RPMI 1640-Medium

RPMI 1640-Pulver	10 g
NaHCO ₃	2 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
Sterifiltriert	

Kulturmedium - Komplettmedium

Fetales Kälberserum	10 % (v/v)
Pferdeserum	5 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
in RPMI 1640-Medium	

2.3.3 Langzeitaufbewahrung, Gefrierkonservierung und Revitalisierung

Zur Langzeitkonservierung von HIT-T15-Zellen wurde ein Teil der Zellen mit 10 % DMSO versetztem Medium bei -196°C in einem Tank mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Konservierung wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 15-cm-Zellkulturschale mit Trypsin/EDTA gelöst und in 50-ml-Röhrchen gegeben. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit Komplettmedium und eine anschließende Aufnahme in 1,35 ml Komplettmedium pro Einfrier-Röhrchen. Pro Einfrier-Röhrchen wurden desweiteren 150 µl DMSO hinzugegeben. Jeweils 1,5 ml der Zellsuspension wurde auf die sterilen Einfrier-Röhrchen verteilt und sofort für eine Stunde auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen für ca. 2 Wochen bei -80°C zwischengelagert, um schließlich der Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff zugeführt zu werden. Das enthaltene DMSO bewahrt die Zellen vor der Zerstörung durch Eiskristalle, stellt aber gleichzeitig eine toxische Substanz für lebende Zellen bei Temperaturen über 10°C dar. Dementsprechend ist eine schnelle Bearbeitung während des Auftauens der Zellen erforderlich. Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt und anschließend in ein mit 10 ml Komplettmedium (37°C) gefülltes 50-ml-Röhrchen gegeben. Es folgten eine Zentrifugation für 2 min bei 1300 UpM und ein Waschschriff mit Komplettmedium, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml Komplettmedium aufgenommen, resuspendiert und auf eine Zellkulturschale gegeben. Die HIT-T15 konnten im Anschluss an die beschriebenen Schritte kultiviert und für Experimente verwendet werden.

2.4 Arbeiten mit DNA

2.4.1 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese diente dem gezielten Mutieren von Basen innerhalb eines bestimmten DNA-Abschnittes. Hierbei sollte die durch *in silico* Analyse entdeckte Kernerkennungssequenz der DLK mutiert werden, um deren Funktion zu untersuchen. Als Verfahren wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benutzt, welches ein *in vitro* Verfahren zur selektiven, exponentiellen Amplifikation von DNA darstellt. Eine PCR-Reaktion besteht klassischerweise aus mehreren Zyklen einer dreistufigen Reaktionsfolge: einem Denaturierungsschritt der Template-DNA durch Erhitzen, einer Hybridisierung von Primer und Template sowie einem Elongationsschritt, bei dem die DNA durch die Polymerase synthetisiert wird. Benötigt werden hierzu ein Template, zwei flankierende Primer, Nukleotide, Puffer und eine DNA-Polymerase. Ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer flankieren den zu amplifizierenden Segmentabschnitt in entgegengesetzter Orientierung. Als Polymerase kam die Pfu-Polymerase zum Einsatz, welche aus dem *Pyrococcus furiosus* gewonnen wird und eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die eine Korrekturaktivität mit sich bringt (proofreading). Hierbei wird eine höhere Synthesegenauigkeit im Vergleich zur Taq-Polymerase erreicht. Die DNA-Polymerase synthetisiert beginnend vom jeweiligen Primer in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang zur Template-DNA.

Die Kernerkennungssequenz erstreckt sich auf die Aminosäuren 185 – 200. Zur gezielten Mutation in Alanin wurden die Aminosäuren K186, R188, K196, R199 und K200 ausgewählt. Insgesamt wurden drei Mutanten hergestellt. Die NLS 1 trägt zwei mutierte Aminosäuren am Anfang der Kernerkennungssequenz (AS 186, 188), während die NLS 2 drei Mutationen am Ende der Kernerkennungssequenz trägt (AS 196, 199, 200). Die NLS Doppel trägt sowohl die Mutationen der DLK NLS 1 als auch die der DLK NLS 2. Die Tab. 2.2 gibt Aufschluss über die einzelnen Mutationen. Tab. 2.3 zeigt die für die Herstellung der Mutanten notwendigen Basenmutationen und Abb. 2.3 stellt ein Schema der durchgeführten Mutagenese dar.

Tab. 2.2: Aminosäuresequenz der DLK-Mutanten. Die in Alanin mutierten Aminosäuren sind dick gedruckt.

Konstrukt	Aminosäuresequenz (185-203)
DLKwt	KKVRDLKETDIKHLRKLKH
DLK NLS 1	K AVAD LDKETDIKHLRKLKH
DLK NLS 2	KKVRDLKETD IAHLA ALKH
DLK NLS Doppel	K AVAD LDKETD IAHLA ALKH

Tab 2.3: Aminosäureaustausch und entsprechende Basenmutationen zur Herstellung der DLK-NLS-Mutanten.

Aminosäureaustausch	Mutationen
K186A	AAG → GCG
R188A	CGA → GCA
K196A	AAG → GCG
R199A	CGA → GCA
K200A	AAG → GCG

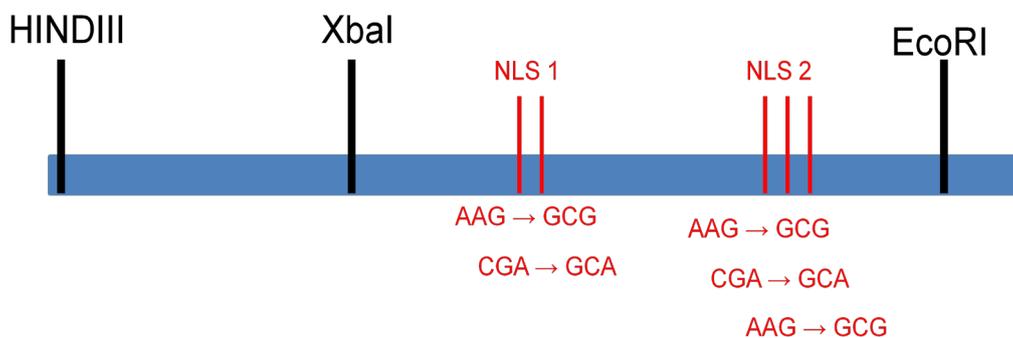


Abb. 2.3: Mutagenese der DLK-NLS-1- und -NLS-2-Mutanten. Zur Mutagenese der DLK NLS 1 wurden zwei, zur Mutagenese der DLK NLS 2 drei Basentriplets mutiert. Der blaue Balken repräsentiert einen Teil der DLKwt DNA, welche als Template für die PCR diente. Zur Orientierung sind Restriktionsenzymstellen innerhalb der Template DNA angegeben.

Durchführung

Die Mutanten DLK NLS 1 und NLS 2 wurden unabhängig voneinander in analoger Weise hergestellt. Dabei sollte der erste Primer in der Mitte die gewünschte Mutation tragen, während der zweite die komplementäre Sequenz zum ersten Primer darstellt (siehe Abb. 2.4). Die zwei weiteren Primer sollten an den Restriktionsschnittstellen XbaI und EcoRI hybridisieren und das zu mutierende Stück von den Enden flankieren. Mit je einem mutierten und einem der äußeren Primer wurden, jeweils separat, die linke und die rechte Fragmenthälfte, amplifiziert (siehe Abb. 2.4 PCR 1). Der DLK-Wildtyp diente hierbei als Template. Zur Optimierung des PCR-Ergebnisses wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet, welches insbesondere die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA unterbindet und damit die Amplifikation erleichtert. Die PCR-Produkte wurden über eine Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 2.4.3) auf ihre Größe und Reinheit kontrolliert, anschließend aufgereinigt (siehe

Kap. 2.4.5) und eine primerlose PCR mit ihnen durchgeführt. Da die Produkte im Bereich der mutierten Primer überlappen, können sie miteinander hybridisieren und in einer weiteren PCR verlängert werden (siehe Abb. 2.4 PCR 2). Das hieraus resultierende PCR-Produkt trägt nun die gewünschte Mutation. Um die Ausbeute an diesem Produkt zu steigern, folgte eine weitere PCR ohne vorherige Aufreinigung mit den flankierenden Primern (siehe Abb. 2.4 PCR 3). Das entstandene PCR-Produkt (M 363 bp, siehe Abb. 2.5) wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und EcoRI inkubiert, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend aufgereinigt. Es wurde nun für Ligation, Transformation, Mini-Präparation und die sich anschließende Sequenzierung eingesetzt. Hierdurch wurde der Mutationserfolg überprüft. Konnte die Mutation durch die Sequenzierung nachgewiesen werden, schloss sich die Herstellung von größeren Mengen Plasmid-DNA durch eine Maxipräparation an (siehe Kap. 2.4.11). Tab. 2.4 zeigt die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionen, während Tab. 2.5 die verwendeten PCR-Programme wiedergibt.

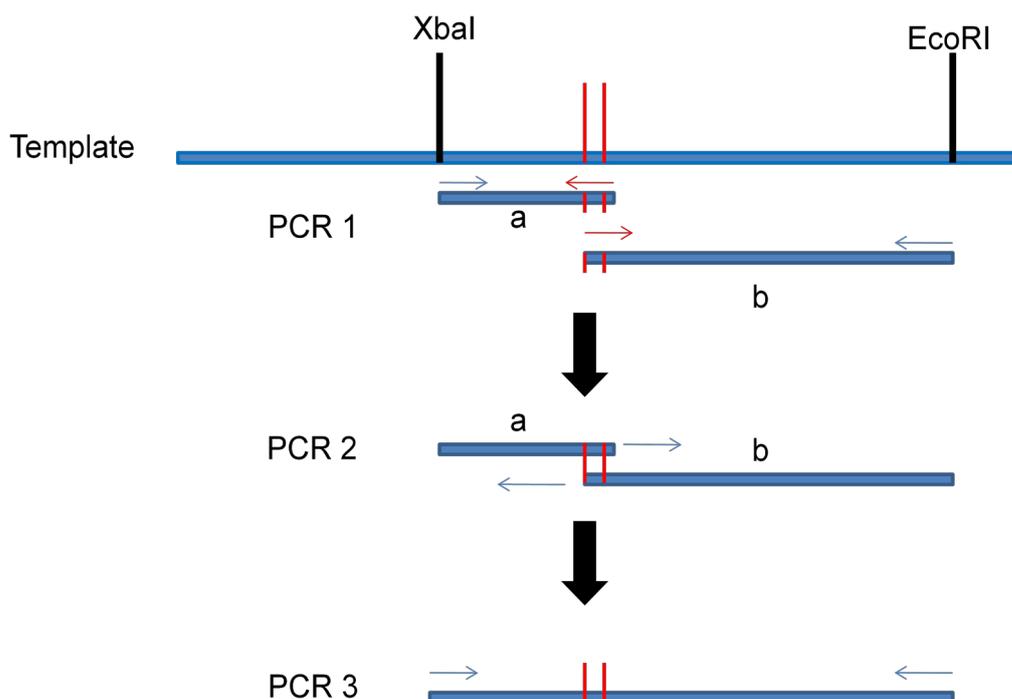


Abb. 2.4 Zielgerichtete Mutagenese. Die roten Striche zeigen schematisch die einzufügenden Mutationen. Als Template dient der DLK-Wildtyp (pDLKwt). Im PCR-Schritt 1 erfolgen mit a und b zwei separate PCR-Reaktionen. Die roten Pfeile zeigen die mutationstragenden Primer, während die blauen Pfeile lediglich die flankierenden Primer symbolisieren. Zusammen bilden jeweils ein blauer und ein roter Primer ein Primerpaar. PCR 2 stellt die primerlose PCR dar, bei der die Fragmente a und b sich gegenseitig als Primer dienen. PCR 3 dient der Verbesserung der Ausbeute durch Amplifikation des PCR-Produktes.

2. Material und Methoden

Zur Herstellung der DLK NLS Doppel-Mutante diente die neu synthetisierte DLK-NLS-1-Mutante als Template. Zur gezielten Mutagenese wurden die gleichen Primer wie zur Herstellung der DLK NLS 2 verwendet. Auf diese Weise wurde eine DLK-Mutante erhalten, die sowohl die Mutationen der DLK NLS 1 als auch diejenigen der DLK NLS 2 trägt.

Tab. 2.4: PCR-Ansätze

	PCR 1	PCR 2	PCR 3
DNA	1 µl (100ng)	3 µl Fragment a 3 µl Fragment b	1 µl Fusionsprodukt
10 X Puffer	5 µl	10 µl	5 µl
dNTP's	1 µl	2 µl	1 µl
DMSO	1,5 µl	-	-
Primer 3'	0,5 µl	-	0,5 µl
Primer 5'	0,5 µl	-	0,5 µl
Pfu Polymerase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	40 µl	81,5 µl	41,5 µl
Gesamtvol	50 µl	100 µl	50 µl

Tab. 2.5: PCR-Programme im PCR-Gradientencycler

PCR 1	PCR 2	PCR 3
95°C für 3 min	94°C für 1 min	95°C für 3 min
95°C für 1 min	94°C für 1 min	95°C für 1 min
50°C für 1 min	30+/- 20°C für 1 min	50°C für 1 min
72°C für 2 min	72°C für 90 s	72°C für 2 min
72°C für 10 min	72°C für 5 min	72°C für 10 min
35 Zyklen	25 Zyklen	35 Zyklen

Bei dieser Methode zur Mutagenese stellte sich zunächst folgendes Problem: Zwar lieferte die zielgerichtete Mutagenese Klone mit der korrekten Fragmentlänge des Mutationsstücks und auch die nachfolgende Ligation, Transformation und Mini-Präparation zeigte Ergebnisse, jedoch wurde durch die Sequenzierung ersichtlich, dass ausschließlich Konstrukte, welche frei von Mutationen waren, also dem DLK-Wildtyp entsprachen, entstanden waren.

Als Ursache hierfür kann die 3'-5' Exonukleaseaktivität der Pfu-Polymerase angesehen werden, welche auch einzelsträngige mutationstragende Primer als falsch erkennt und von ih-

rem 3'-Ende soweit abbaut, dass keine Mutationen mehr enthalten sind. Das Problem wurde durch das Bestellen neuer Primer, bei denen der völlig homologe Bereich am 3'-Ende ausreichend lang war, gelöst. Um den exonukleasebedingten Abbau der Primer weiter zu verringern, wurden höhere Primerkonzentrationen für die PCR verwendet.

2.4.2 Restriktionsenzymverdau

Bei den verwendeten Restriktionsenzymen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) handelt es sich um Endonukleasen, welche spezifische Nukleotidsequenzen, meist Palindrome von vier bis acht Nukleotiden, innerhalb der DNA erkennen und schneiden (siehe Tab. 2.6). Die DNA liegt nach dem Schneiden an einer Stelle in linearisierter Form vor. Um definierte DNA-Bruchstücke zu isolieren, wird mit Restriktionsenzymen inkubiert, welche an zwei oder mehreren Stellen schneiden. Auf diese Weise entstehen Fragmente mit definierter Länge. Da die Effizienz der Restriktionsenzyme abhängig von der Reinheit der DNA ist (Sambrook et al. 1989), wurde diese Methode auch zur Kontrolle der Qualität der DNA herangezogen. Für einen Verdau mit Restriktionsenzymen wurden jeweils 1 µg DNA bzw. der gesamte PCR-Ansatz eingesetzt. Es wurden sterilisiertes H₂O, die entsprechende Menge 10x Tango Yellow reaction buffer und 5 Einheiten von einem bzw. zwei Restriktionsenzymen hinzugegeben. Der Gesamtansatz betrug 15 – 30 µl. Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37°C über Nacht. Danach wurde der Ansatz mit 6x Loading buffer versetzt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

Tab. 2.6: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Schnittstelle
EcoRI	5'...G AATTC...3' 3'...CTTAA G...5'
HindIII	5'...A AGCTT...3' 3'...TTCGA A...5'
XbaI	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC T...5'

6x Loading buffer

Glycerin	30 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)
gelöst in H ₂ O bidest	

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von DNA nach ihrer Fragmentgröße. Es lassen sich auf diese Weise Fragmente von 0,1 bis 25 kb Länge voneinander unterscheiden. Die negativ geladenen Nukleotide wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Anzahl der Basenpaare und der Sekundärstruktur. Bei ringförmiger DNA können auch *coiled* und supercoiled-Strukturen auftreten, welche aufgrund ihrer höheren Kompaktheit schneller wandern und in den Gelen deshalb bei scheinbar kleineren Molmassen nachgewiesen werden. Die DNA wird mit Hilfe von Ethidiumbromid, einer interkalierenden Substanz, welche an die DNA bindet und durch kurzwelliges UV-Licht angeregt werden kann, sichtbar gemacht. Je nach erwarteter Fragmentlänge wurde die Agarosekonzentration im TAE-Puffer variiert. Tab. 2.7 zeigt die verwendeten Agarosekonzentrationen.

Tab. 2.7: Agarosekonzentrationen

Fragmentlänge	Agarosekonzentration (w/v)
1 bis 30 kb	0,5 %
0,8 bis 12 kb	0,7 %
0,5 bis 7 kb	1,0 %
0,4 bis 6 kb	1,2 %
0,1 bis 2 kb	2,0 %

Durchführung

Die Agarose im Elektrophoresepuffer wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen der heißen Agaroselösung wurde diese mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Gelschlitten gegossen.

2. Material und Methoden

Um Taschen für die Proben zu erhalten wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Abkühlen erhielt man schließlich das Gel, welches in eine Elektrophoresekammer gelegt wurde. Das Gel wurde mit TAE-Puffer begossen bis es knapp bedeckt war. Danach wurde 1/6 der Endkonzentration 6x Loading buffer zur DNA-Probe hinzugegeben. Anschließend wurden die zu untersuchende DNA (ca. 20 µl) sowie ein DNA-Größenmarker (5 µl) in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 90 Volt (ca 0,5 V/cm²) angelegt. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die DNA-Banden konnten mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert werden. Für die Größenbestimmung der Fragmentgrößen wurde in jedem Gel ein Größenmarker aufgetragen. Es wurden hierbei der GeneRuler™ 1 kb für Fragmente von 250-10000 bp sowie der GeneRuler™ 100 bp für Fragmente von 80-1000 bp eingesetzt. Ein Drucker am Gerät diente der Dokumentation des Ergebnisses.

Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer)

Tris/HCl (pH 8,0)	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA (pH 8,0)	50 mM
gelöst in H ₂ O	

2.4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird spektralphotometrisch durch Extinktionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter Lösung (Sambrook et al. 1989). Die Konzentration lässt sich demnach folgendermaßen berechnen $C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Wird gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, so kann aus dem Verhältnis der $OD_{260/280}$ die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Reine DNA sollte einen $OD_{260/280}$ -Quotienten zwischen 1,80 und 2,0 aufweisen. Eine weitere Möglichkeit, DNA-Mengen zu bestimmen, besteht in der Abschätzung der Bandenintensität auf Agarosegelen im Vergleich zu bekannten DNA Mengen. Durch dieses Verfahren konnten unterschiedliche Expressionsvektoren verglichen werden.

2.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA Bande der gewünschten Größe wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Beim Ausschneiden wurde möglichst schnell gearbeitet, um Schäden an der DNA durch das UV-Licht zu vermeiden. Da DNA sehr empfindlich gegenüber UV-Licht ist, kann dies die Klonierung stark beeinträchtigen und kann darüber hinaus selbst zu Mutationen führen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte anschließend mittels Easy Pure[®] DNA Purification Kit gemäß den Angaben des Herstellers.

2.4.6 Klonierung

Bei der Klonierung werden ein Vektor und ein DNA-Fragment verdaut, gereinigt, miteinander ligiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert und selektioniert.

Der Vektor

Als Ausgangsvektor wurde der Vektor pCNDA3 verwendet, welcher den DLK-Wildtyp zwischen den Restriktionsenzymstellen der Multiple Cloning Site HindIII und XbaI enthält. Um das durch die Mutagenese gewonnene mutierte DNA-Fragment in die DLK kodierende Sequenz zu klonieren, wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI inkubiert (siehe Kap. 2.4.2). Die entstandenen Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt und aufgereinigt (siehe Kap. 2.4.3 und 2.4.5). Wie aus der Abb. 2.5 zu entnehmen ist, waren besonders die Fragmente I (2000 bp) und II (5800 bp) von Interesse für die weitere Klonierung.

Dephosphorylierung des 5'-Endes der DNA

Linearisierte Vektoren, deren Enden identische Restriktionsenzymstellen besitzen, zeigen eine hohe Wiederverknüpfungstendenz (Religationsrate). Um diese Selbstligationsrate des Vektors zu verringern, wurde eine Inkubation mit der Alkalischen Phosphatase durchgeführt. Da innerhalb des Vektors zwei Schnittstellen für XbaI vorhanden waren, lieferte der Restriktionsenzymverdau mit diesem Restriktionsenzym das Fragment II, welches zwei kompatible Enden besitzt, die wieder miteinander ligieren konnten. Da dieser Aspekt die Anzahl der gewünschten Klone drastisch zu reduzieren vermag, wurde das Fragment II mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase CIAP) dephosphoryliert und somit die nach dem Restriktionsverdau übrig gebliebenen Phosphat-

2. Material und Methoden

reste an dem 5'-Enden entfernt. Die Selbstligation wurde somit verhindert. Die Fragmente M und II besaßen hingegen noch die 5'-Phosphatreste und konnten in den Vektor ligieren. Zuerst wurden dafür 20 µl DNA-Lösung zusammen mit 5 µl 10x Reaktionspuffer für CIAP sowie 24 µl sterilisiertem Wasser und 1 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch 15-minütiges Erhitzen bei 85°C gestoppt. Es folgte die Aufreinigung der DNA mittels Easy Pure® DNA Purification Kit.

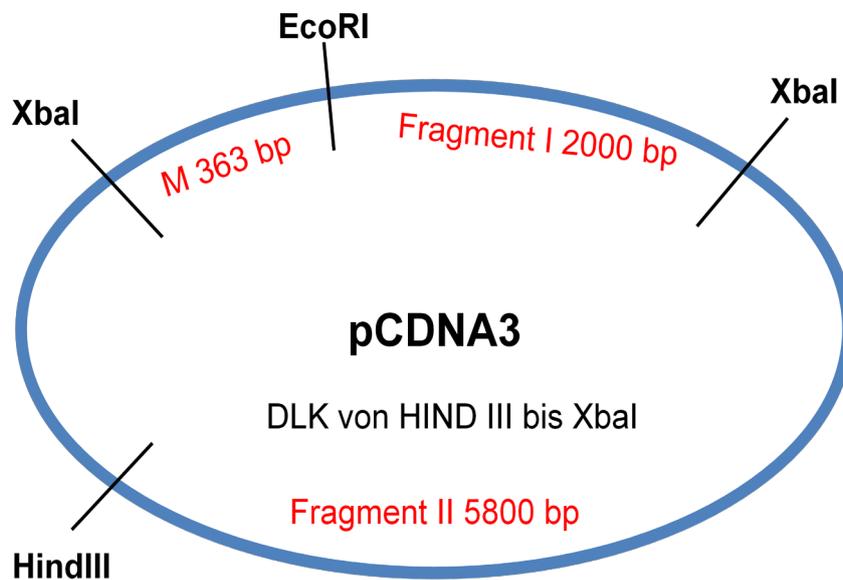


Abb. 2.5: DLK-Konstrukte innerhalb des Expressionsvektors pCDNA3. Das hergestellte Mutationsstück M 363 bp liegt zwischen den Restriktionsschnittstellen Xbal und EcoRI. Die genetische Information für die DLK erstreckt sich von HindIII zur Xbal Schnittstelle am oberen rechten Bildrand.

Das DNA-Fragment

Das mutierte DNA-Fragment (siehe Kap. 2.4.1) hat eine Länge von 363 bp, trägt die gewünschten Mutationen und besitzt an den Enden Restriktionsschnittstellen für Xbal und EcoRI. Somit gelangt es bei der Ligation an die Position des Fragments "M 363 bp" des ursprünglichen Plasmids.

2.4.7 Ligation von DNA

Unter Ligation wird die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels einer DNA-Ligase verstanden. Für die Ligation wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert eine Reaktion, bei der das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende von Nukleinsäuren verbunden werden. Für die Ligation wurde das zu ligierende Fragment im Überschuss eingesetzt. Es wurden entsprechende Mengen an 10x Ligase Puffer und sterilisiertes H₂O hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 16°C. Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation und nachfolgender Mini-Präparation eingesetzt. Das Verfahren wurde zur Herstellung der DLK NLS 1, NLS 2, NLS Doppel genutzt.

Ligationsansatz für DLK-Mutanten

Fragment I	3 µl
Fragment II (dephosphoryliert)	2 µl
Mutationsstück M	5 µl
T4-Ligase	1 µl
Ligase Puffer	1,5 µl
H ₂ O ad 15 µl	2,5 µl

2.4.8 Restriktionsenzymverdau der klonierten Expressionsvektoren

Da Fragment II zwei Enden mit XbaI Schnittstellen besitzt, besteht die Möglichkeit, dass Fragment I und das Mutationsstück in inverser Orientierung mit dem Fragment ligieren. Um die Orientierung zu überprüfen, wurden 7 µl der Mini-Präparation mit EcoRI und HindIII einem asymmetrischen Verdau unterzogen und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Erfolgte die Ligation in antidromer Orientierung, ergab sich nach dem Restriktionsverdau ein Fragment mit einer Länge von ca. 2500 bp. Dieses Fragmente wurde verworfen. Ein Klon, welcher die Mutation in orthodromer Orientierung trägt, liefert nach Restriktionsverdau ein Fragment mit einer Größe von 671 bp. Nur diese Klone wurden für die Sequenzierung eingesetzt.

2.4.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung diente der Kontrolle von Klonierungsschritten. Mit Hilfe der Sequenzierung lässt sich Aufschluss über die exakte Nukleotidabfolge innerhalb eines zu untersuchenden DNA-Moleküls erlangen. Die benutzte Methodik basiert auf der Didesoxymethode (Ket-

tenabbruchmethode) nach Sanger et al. (1977). Hierzu wurde der Sequenzierungskit Big Dye[®] Terminator v 1.1 verwendet, welcher neben gewöhnlichen dNTP's und einer temperaturstabilen Taq-DNA-Polymerase auch fluoreszenzgekoppelte Didesoxynucleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP) enthält. Anders als bei der PCR wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die DNA nur linear amplifiziert wird. Nach Binden des Primers an die zu sequenzierende DNA kommt es bei der PCR zur Synthese von identischen Fragmenten bestimmter Länge, da es beim Einbau der Didesoxynucleotiden, denen die 3'-Hydroxygruppe fehlt, zu einem Synthesestopp kommt. Das Verhältnis der fluoreszenzgekoppelten Didesoxyribonucleotiden zu den dNTP's führt zur Synthese von Fragmenten in allen Größen. Synthetisierte Fragmente mit identischer Länge enden somit immer mit den gleichen fluoreszenzgekoppelten Didesoxyribonucleotiden und emittieren so ein identisches Fluoreszenzsignal. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge und können so von einem Detektor erkannt und differenziert werden. Das Chromatogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Die dementsprechend komplementäre Sequenz ist die Sequenz der verwendeten einsträngigen DNA-Matrize.

Durchführung

Tag 1

Zuerst wurde die PCR für die Sequenzierung in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert, gut durchgemischt und kurz anzentrifugiert. Es folgte die PCR im PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Abteilung Klinische Pharmakologie. Es kam hierbei folgendes Programm zum Einsatz:

Tab. 2.8: PCR-Programm für die Sequenzierung

Programmablauf	
1.	94°C für 2 min
2.	96°C für 15 s
3.	56,5°C für 15 s
4.	60°C für 4 min
5.	24 Wiederholungen (2-4)
6.	72°C für 7 min
7.	4°C Pause

2. Material und Methoden

Es folgte die Reinigung der Sequenzierungsprodukte mit Sephadex G 50 auf einer 96iger Millipore-MAHV N45 Platte. Hierfür wurde Sephadex G50 (Amersham 100 g Superfine) mit einem Spatel auf eine Lochplatte gegeben und mit einem Glasschaber in die Löcher geschoben. Der Überschuss wurde abgestreift. Die Millipore-Platte wurde umgedreht auf die Lochplatte gesetzt. Die beiden Platten wurden fest zusammengedrückt, umgedreht und von oben beklopft. Das Sephadex sollte nun in die Millipore-Platte überführt worden sein. Danach wurden pro Vertiefung 300 µl autoklaviertes H₂O mit einer Multipipette auf das Sephadex gegeben. Die Millipore-Platte wurde mit einem Deckel abgedeckt und auf eine ELISA-Platte, welche als Ständer diente, gestellt. Die Platten wurden aneinander mit Klebeband fixiert. Das Sephadex quoll bei 4°C über Nacht.

Tag 2

Die Sephadex Platte wurde aus dem Kühlschrank genommen und auf eine leere Platte gestellt. Sie wurde für 5 min bei 1800 UpM zentrifugiert. Das Filtrat in der Abfallplatte wurde verworfen und die Abfallplatte wurde wieder unter die Millipore-Platte gestellt. Pro Vertiefung wurden nun 150 µl H₂O auf das Sephadex gegeben und für 30 min bei RT quellen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die PCR-Produkte mit 30 µl sterilisiertem H₂O versetzt, gut durchgemischt und abzentrifugiert. Die Sephadex-Platte wurde nach Inkubation erneut für 5 min bei 1800 UpM zentrifugiert. Nun wurde die endgültige Sequenzierplatte unter die Sephadex-Platte gestellt. Die PCR-Produkte wurden mittels 8-Kanalpipette in die Mitte der gequollenen Sephadex-Säulen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1800 UpM. Das gewonnene Filtrat in der Sequenzierplatte wurde nun für die Sequenzierung benutzt. Die Sequenzierplatte wurde in eine Platte für das ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer Sequenzierungsgerät gestellt und die Sequenzierung wurde gestartet. Die Basenabfolge konnte anschließend direkt am Computer ausgewertet werden.

Sequenzierungsansatz

DNA	300 ng
Primer	10 pmol
Big Dye [®]	1,8 µl
DMSO	0,5 µl
H ₂ O	ad 10 µl

2.4.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Mini-Präparation auf der Grundlage von alkalischer Lyse und alkoholischer Fällung der DNA dient der schnellen Isolierung von DNA, z.B. um schnell Produkte einer Ligation zu überprüfen (Sambrook et al. 1989). Die Ausbeute ist in der Regel gering und die Reinheit der DNA nicht besonders hoch.

Durchführung

Von den nach der Transformation (siehe Kap. 2.2.9) gewachsenen Bakterien der LB-Amp-Agar Platte wurden einzelne Kolonien gepickt und in einem Falcon Plastikröhrchen mit 3 ml LB-Amp (50 µg/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 3.200 g (6000 UpM) für 2 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 100 µl Lösung 1 resuspendiert, bevor es für 10 min auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 schnell dazu gegeben, gemischt, für exakt 5 min auf Eis gelagert und schließlich 150 µl Lösung 3 langsam hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals gekippt und für 10 min bei 20.800 g (14.000 UpM) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Trennung der DNA von den Proteinen durch Hinzufügen von 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Emulsion wurde auf einem Vortexer gut geschüttelt und anschließend für 10 min mit 20.800 g (14.000 UpM) bei 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zum Fällen der DNA wurde $\frac{1}{10}$ des Probenvolumens von Lösung 3 und das doppelte Probenvolumen 99 %iges Ethanol hinzugefügt sowie für 20 min bei -20°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 20.800 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend wieder bei 20.800 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in der Speed-Vac getrocknet und es wurden 21 µl RNase (0,1 mg/ml) (Quiagen, Hilden, Deutschland) dazugegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 37°C für 30 min.

Puffer und Lösungen

Lösung 1

Tris/HCl pH 8,0	25 mM
Glucose	50 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Lysozym (frisch zugesetzt)	2 mg /1 ml Puffer 1

2. Material und Methoden

Lösung 2

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)
in H ₂ O gelöst	

Lösung 3

Na-Acetat pH 4,8	3 M
------------------	-----

2.4.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation (modifiziert nach Sambrook et al. 1989) dient im Gegensatz zur Mini-Präparation der Aufreinigung von größeren Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad. Als Substrat dienen hierbei transformierte und amplifizierte E. coli Stämme, welche in einem ersten Schritt lysiert werden. Die endgültige Reinigung wurde mit einer Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation erreicht. Zentrifugiert man eine CsCl-Lösung ausreichend lange bei hoher Geschwindigkeit, so stellt sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens eine höhere Konzentration des schweren Salzes ein, während die Konzentration nach oben hin abnimmt. Da sich Proteine, RNA und DNA in ihrer Dichte unterscheiden, kann man diesen Gradienten zur DNA-Reinigung nutzen. Durch Einsetzen von Ethidiumbromid kann zusätzlich die Plasmid-DNA von bakterieller DNA getrennt werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen und verwandelt diese in einen DNA-Ethidiumbromid-Komplex, der eine geringere Dichte als DNA besitzt. Plasmid-DNA liegt als supercoiled DNA vor und kann dadurch weniger Ethidiumbromid einbauen. Die Dichte der Plasmid-DNA ist daher höher als die linearisierter DNA und die beiden DNA-Typen können in einem CsCl-Dichtegradienten voneinander getrennt werden.

Durchführung

Für die Maxipräparation wurden die nach Minipräparation positiv getesteten Bakterienkulturen verwendet. Zu diesem Zweck wurde an eine Minipräparation ein Restriktionsenzymverdau sowie eine Sequenzierung angeschlossen. Eine Einzelkolonie von transformierten, auf LB-AMP-Agarplatten ausgestrichenen Ampicillin-sensiblen E. coli des Stammes DH-5 α wurde gepickt und eine Ampicillin-haltige (50 μ g/ml) 25 ml Vorkultur in einem 50 ml Falcon Plastikröhrchen angeimpft, welche über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 UpM inkubiert wurde. Die inkubierte Vorkultur wurde nun in 1 l Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und weiter im Schüttelinkubator bei gleichbleibenden Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀

von 0,8 inkubiert. Beim Erreichen dieser optischen Dichte wurde das Bakterienwachstum durch Zugabe von 5 ml Chloramphenicol gestoppt. Chloramphenicol wirkt durch Hemmung der Proteinbiosynthese bakteriostatisch. Die Vermehrung der Plasmid-DNA innerhalb der Bakterien wird jedoch nicht beeinträchtigt und es kommt zu einer Anreicherung jener Plasmid-DNA. Die Kultur wurde nochmals über Nacht unter unveränderten Bedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur auf vier Zentrifugenbecher verteilt und in einer vorgekühlten Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2-21 mit Beckman JA-14 Rotor) für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgegossen, die Pellets mit 11,25 ml eiskalter STE-Lösung resuspendiert und jeweils zwei Bakterienextrakte in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. In jedes Zentrifugenröhrchen wurde 1,5 ml Lysozym-Lösung hinzugegeben und geschüttelt. Es folgte eine Inkubationsphase von 20 min auf Eis, bevor 1,8 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) hinzugegeben wurden. Die Proben wurden für 5 min auf Eis gelegt, bevor schließlich 14,4 ml Triton-Mix hinzugegeben wurden. Zum Lysieren der Zellen wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min kräftig geschwenkt. Im Anschluss wurden die Zelllysate für 1 h bei 16.000 UpM und 4°C zentrifugiert (Beckman JA-20 Rotor) und die Überstände in einem 250 ml Zentrifugenbecher vereinigt. Es wurden 40 ml einer PEG-Lösung hinzugefügt und für eine Stunde, bis es zu einem Ausfallen der DNA kam, inkubiert. Es folgte eine zehn-minütige Zentrifugation bei 10.000 UpM und 4°C (Beckman Ja-14 Rotor). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Speed-Vac vollständig getrocknet, bevor es in 10 ml TNE-Puffer resuspendiert wurde. Zu dem resuspendierten Pellet wurden exakt 10,9 g CsCl und 150 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugegeben und anschließend diese Suspension in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt, auf 0,05 g genau austariert und versiegelt. Es folgte die Zentrifugation für 20 Stunden bei 60.000 UpM und 20°C (Beckman Ultrazentrifuge L5-65, 70,1-Ti-Rotor) zum Ausbilden des CsCl-Dichtegradienten. Die Bande für die Plasmid-DNA wurde mit einer 5 ml Spritze und einer 20-G-Kanüle abgezogen und in ein 15 ml Falcon Plastikröhrchen gegeben. Um das interkalierende Ethidiumbromid aus der DNA-Lösung zu entfernen, wurde fünfmal äquivalentes Volumen an Isoamylalkohol hinzugefügt, auf einem Vortexer gemischt, bei 3000 UpM für 30 sec abzentrifugiert und die obere Phase verworfen. Die DNA-Lösung sollte anschließend farblos sein. Um auch das Cäsiumchlorid aus der Lösung zu entfernen, wurde die gewonnene DNA in einen Dialyseschlauch gefüllt und zweimal für jeweils 12 Stunden mit 1 l TE-Puffer pro Probe bei 4°C dialysiert. Schließlich wurde die DNA aus dem Dialyseschlauch in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration bzw. die Reinheit der DNA konnte mit einem Spektralphotometer bei 260 und 280 nm bestimmt werden. Das Plasmid wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau und der Agarosegelelektrophorese auf seine Korrektheit überprüft.

2. Material und Methoden

Puffer und Lösungen

STE- Lösung

Saccharose	25 % (w/v)
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

gelöst in H₂O bidest
50 ml pro Konstrukt

Lysozym- Lösung

Lysozym	60 mg
STE-Lösung	1 ml

3 ml pro Konstrukt

Triton-Mix

Triton X-100	0,1 % (v/v)
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	60 mM

gelöst in H₂O bidest
30 ml pro Konstrukt

PEG- Lösung

PEG 6000	30 % (w/v)
NaCl	1,5 M

gelöst in H₂O bidest
40 ml pro Konstrukt

TNE-Puffer

Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
NaCl	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

gelöst in H₂O bidest
10 ml pro Konstrukt

TE- Puffer

Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
gelöst in H ₂ O bidest	
2 x 1 L pro Konstrukt	

2.5 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Unter Transfektion von Zellen versteht man das Einbringen von DNA in Zellen. Bei einer Vielzahl von Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit die transiente Transfektion mit der DEAE-Dextran Methode sowie die Transfektion mit METAFECTENE[®] verwendet. Bei diesen Methoden wurden in unserer Abteilung deutlich höhere Transfektionseffizienzen beim Einsatz in HIT-T15 Zellen erzielt. Die Transfektion mit METAFECTENE[®] liefert eine etwas größere Transfektionseffizienz als die DEAE-Dextran Methode. Sie beläuft sich jedoch auf maximal 14,13 % (Kutschenko 2008). Die älteste der Transfektionsmethoden nutzt DEAE-Dextran, um die DNA in die Zelle einzuschleusen. Die DNA wird bei dieser Methode an Polykationen gebunden. Die Dextran-DNA-Komplexe werden dabei auf die Zellen pipettiert, von denen sie per Endocytose aufgenommen und exprimiert werden. Bei der Transfektion mit METAFECTENE[®] handelt es sich um eine Transfektion mit einem kationischen Liposom (Felgner et al. 1987). Diese kationischen Liposomen werden mit der anionischen DNA vermischt und es entsteht ein Liposomen-DNA-Komplex. Der entstandene Komplex wird zu den Zellen pipettiert und fusioniert mit der Zellwand. Die DNA gelangt auf nicht geklärte Weise in den Zellkern.

Die Zellen wurden für dieses Verfahren 48 h inkubiert. Zur Transfektion wurden Expressionsvektoren verwendet, die über einen Cäsiumchloridgradienten gereinigt wurden. Die verwendeten Expressionsvektoren wurden in Bakterien vermehrt und besitzen einen Replikationsursprung und ein Resistenzgen. In der eukaryotischen Zelle findet hingegen nur die Expression des gewünschten Gens statt. Zur kompletten Ausstattung der verwendeten Plasmide siehe Kapitel 2.2.7 und 2.2.8.

2.5.1 METAFECTENE[®] - Methode

Die METAFECTENE[®]-Methode wurde für Transfektion von Zellen bei immunzytochemischen Experimenten (Immunfluoreszenz, Immunogold-Elektronenmikroskopie) sowie bei Trans-

2. Material und Methoden

fektionen für Expressionsanalysen und Auswertung mittels Western Blot verwendet. Hierzu wurden HIT-T15-Zellen einer konfluent bewachsenen 15-cm Zellkulturplatte (30×10^6 Zellen) je nach Fragestellung entsprechend ausplattiert. Nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgte die Transfektion innerhalb der ersten Stunde. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit RPMI-Medium ohne Zusätze auf die entsprechende Menge aufgefüllt (siehe Tab. 2.9). Für die Immunfluoreszenzversuche wurden pro Vertiefung der 6-well Platte 2 µg DNA, für die Elektronenmikroskopie jeweils 0,33 µg DNA pro Vertiefung der 96-well Platte und für die Expressionsanalyse jeweils 2 µg DNA pro 6 cm-Schale eingesetzt. Für die Immunfluoreszenzansätze resultierte ein Volumen von 100 µl, für die Elektronenmikroskopie ein Volumen von 12,5 µl und für Expressionsanalysen ein Volumen von 300 µl. In ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 2 µl METAFECTENE[®] pro µg DNA gegeben (Verhältnis 2:1) und mit RPMI-Medium ohne Zusätze auf das gleiche Volumen wie das der DNA-Lösungen aufgefüllt. Die jeweiligen Lösungen wurden einzeln gut durchmischt. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu der METAFECTENE[®]-Lösung gegeben und vorsichtig vermischt. Es folgte eine Inkubation von 15 min. Im Anschluss konnte die entsprechende Menge dieser fertigen Transfektionslösung zu den ausplattierten Zellen pipettiert werden. Bei der Transfektion für die Immunfluoreszenz entsprach dies 200 µl pro well, bei der Elektronenmikroskopie 25 µl pro Vertiefung der 96-well Platte und bei der Expressionsanalyse 600 µl pro 6 cm-Schale.

Tab. 2.9: Pipettierschema der METAFECTENE[®]-Methode

Methode	DNA-Lösung	METAFECTENE [®] -Lösung
Expressionsanalyse	2 µg mit RPMI auf 300 µl	4 µl mit RPMI auf 300 µl
Immunfluoreszenzmikroskopie	2 µg mit RPMI auf 100 µl	4 µl mit RPMI auf 100 µl
Elektronenmikroskopie	0,33 µg mit RPMI auf 12,5 µl	0,66 µl mit RPMI auf 12,5 µl

Puffer und Lösungen

Plasmid- DNA (siehe Kap. 2.2.5 und 2.2.6)

METAFECTENE[®]

RPMI 1640-Medium (ohne Serum und Antibiotikum)

2.5.2 DEAE-Dextran-Methode

Die Methode mit DEAE-Dextran fand Anwendung bei Transfektionen für Reporter-Gen-Assays. Genaue Informationen über die transfizierten Expressionsvektoren und Reportergene befinden sich in Kapitel 3.3.2 – 3.3.5. Eine konfluent bewachsene 15-cm-Zellkulturplatte wurde mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend wurden die HIT-T15 Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA für 5 min gelöst. Die Proteinasewirkung wurde mit 20 ml RPMI-Medium ohne Zusätze gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon Plastikröhrchen überführt und für 2 min bei 1300 UpM bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde mit 10 ml TD-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im gewünschten Volumen TD-Puffer (1 ml / Transfektionsansatz + 1 ml als Reserve) aufgenommen. Die zu transfizierende DNA wurde in die jeweiligen 50-ml-Plastikröhrchen pipettiert. Es wurden 2 µg DNA pro Probe transfiziert. Pro Transfektionsansatz wurden 5 µl DEAE-Dextran hinzugegeben und gut vermischt. Daraufhin wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension zu der DNA gegeben und für genau 15 min bei RT inkubiert. Die Transfektion wurde durch Hinzugeben von Komplettmedium gestoppt. Anschließend wurde zweimal mit Komplettmedium gewaschen. Hierbei wurde jeweils für 2 min bei 1300 UpM und RT zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Zellsuspension in das gewünschte Volumen Komplettmedium (5 ml/Transfektionsansatz) aufgenommen und gleichmäßig auf 6-cm Zellkulturschalen ausplattiert.

Puffer und Lösungen

Plasmid- DNA (siehe Kap. 2.2.7 - 2.2.8)

RPMI 1640-Medium (ohne Serum und Antibiotikum)

DEAE-Dextran: 60 mg/ml H₂O bidest.

TD-Puffer

Tris / HCl pH 7,4	25 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
K ₂ HPO ₄	0,7 mM

2.6 Proteincharakterisierung

Die in diesem Kapitel dargestellten Methoden dienen einerseits der Beschreibung der DLK-Expression und -verteilung und andererseits der Darstellung von phosphoryliertem JNK bzw. der enzymatischen Aktivität der DLK-Mutanten in HIT-Zellen.

2.6.1 Zellyse

Die Zellyse auf Eis erfolgte unter nicht sterilen Bedingungen 48 h nach der Transfektion (siehe Kap. 2.5) der HIT-Zellen. Zu Beginn wurde das Medium aus der 6-cm-Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch schnelle Hinzugabe von 150 μ l Lysis Puffer, in welchem frisch zugesetzte Proteinaseinhibitoren enthalten waren, lysiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in einem Abschnitt der 6-cm-Schale gesammelt und anschließend mit einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Viskosität des Zelllysates zu vermindern, wurden die Zellen mit einer Tuberkulinspritze und einer 27-G-Nadel dreimal geschert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min in Eiswasser stehen gelassen, bevor sie für 5 min in einer auf 2°C vorgekühlten Zentrifuge mit 1400 UpM zentrifugiert wurden, um die Proteine von den übrigen Zelltrümmern zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1 μ l dieses Lysates wurde für die Proteinbestimmung eingesetzt. Der restliche Teil wurde für die anschließenden Experimente bei -20°C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen

Lysis Puffer

Hepes (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)
Na-ortho-vanadat	1 mM
NaF	50 mM
β -Glycerophosphat	20 mM
aufbewahrt bei 4°C	

2.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad-Protein-Assay gemessen. Die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf den drei verschiedenen Zuständen des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250, die jeweils Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren.

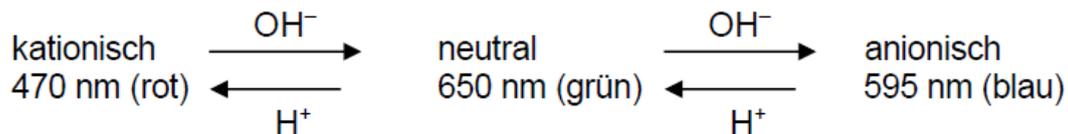


Abb. 2.6: Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford.

Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt, die Absorption kann bei 595 nm gemessen werden. Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional. Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren. Dies erklärt die unterschiedlich starke Absorption verschiedener Proteine. Daher muss der Proteingehalt einer Probe immer auf ein definiertes Protein, hier BSA (bovine serum albumin), bezogen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Kalibrierung durch eine Eichgerade mit BSA in verschiedenen Konzentrationen als Standard angefertigt.

Durchführung

Für die Messung wurde in einer 1 cm Kunststoffküvette 1 µl der Proteinlösung mit 800 µl H₂O bidest. vermischt. Es wurde 200 µl filtriertes Bio-Rad-Reagenz zugesetzt und gemischt. Als Leerwerte wurden zwei Küvetten mit 800 µl H₂O bidest. mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Im Anschluss konnte die Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen werden. Die ermittelten Extinktionswerte wurden mit Hilfe der Eichkurve in Konzentrationen umgerechnet.

2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Hierbei wurde die diskontinuierliche Zonenelektrophorese (Laemmli, 1970) verwendet, bei der das Gel aus zwei unterschiedlichen Gelanteilen besteht: einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Sammelgel (pH 6,8) dient der Fokussierung der Proteine, während es im Trenngel (pH

8,8) zu einer Auftrennung der Proteine kommt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich im Überschuss gleichmäßig an Proteine an, wodurch diese eine negative Ladung erhalten und ihre Tertiär- und Sekundärstruktur verlieren. Um auch die Disulfidbrücken durch Reduktion zu spalten, wird β -Mercapthoethanol hinzugefügt. Bei Anlegen einer Spannung ist die Beweglichkeit der Proteine im SDS-Gel nun proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse. Anschließend wird zur vollständigen Denaturierung des Proteins die Probe für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Zugabe von Bromphenolblau ermöglicht beim Elektrophoreseverlauf eine visuelle Verfolgung. Zur Auftrennung werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und eine Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel bewirkt. Kleine Proteine wandern schneller durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und langsamer migrieren. Das Polyacrylamidgel wird durch Polymerisation einer Acrylamidlösung, welcher ein Tris-Puffer, SDS, H₂O bidest. TEMED (Polymerisationskatalysator) und Ammoniumpersulfat (Radikalstarter) zugesetzt werden, hergestellt. Die Porengröße kann durch die Konzentration an Acrylamid im Trenngel variiert werden. Es wurden Trenngele mit 8 % Acrylamidanteil für den Nachweis von schwereren Proteinen (50 – 130 kDa) sowie Trenngele mit 10 % Acrylamidanteil für den Nachweis von leichteren Proteinen (30 – 100 kDa) verwendet. Tab. 2.10 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele.

Tab. 2.10: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.

Zusammensetzung	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	8 %	10 %	4 %
Acrylamidlösung	2,67 ml	3,3 ml	0,67 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0 ml	0 ml	1,25 ml
SDS (10 % (w/v))	50 μ l	50 μ l	50 μ l
H ₂ O bidest.	4,66 ml	4,0 ml	2,98 ml
Ammoniumpersulfat (10 % (w/v))	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	6 μ l	6 μ l	2,4 μ l

Durchführung

Die Polyacrylamidgele wurden in einer Mighty Small Dual Gießkammer SE 245 unter Verwendung einer Glasplatte (8 x 7 cm) vorne, einer Aluminiumplatte (8 x 7 cm) hinten, zwei Platzhaltern links und rechts zwischen den Platten sowie einem Kamm hergestellt. Diese

2. Material und Methoden

Materialien wurden vor Verwendung mit 70 % Isopropanol gründlich gereinigt und in die Gießkammer eingespannt. Im Anschluss konnte das flüssige Gel zwischen die zwei Platten pipettiert werden. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und bis 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes pipettiert. Das Gel wurde mit 1 ml H₂O bidest. überschichtet, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und eine geradlinige Trennschicht zu gewährleisten. Nach etwa 20-minütiger Inkubation, in denen die vollständige Polymerisierung des Trenngels erfolgte, wurde das H₂O bidest. abgeschüttet, die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert und der Kamm unverzüglich eingesetzt. Nach etwa 30 min bei RT war das Sammelgel polymerisiert und konnte für die Gelelektrophorese verwendet werden. Für die Elektrophorese wurden ein bis zwei Gele in die Mighty Small SE 250 Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und der Kamm wurde aus dem Gel gezogen. Um eventuelle Gelreste aus den Taschen zu entfernen, wurden die Taschen mit einer 20-G-Kanüle und einer 5 ml Spritze mit Laufpuffer gespült. Die Proben mit errechneter gleicher Proteinmenge wurden mit ¼ des Endvolumens 4x Laemmli Puffer versetzt, für 10 min bei 98°C und 800 UpM aufgekocht (Eppendorf Thermomixer), kurz abzentrifugiert und anschließend in die Taschen pipettiert. Es konnten maximal 45 µl eines Proteins eingesetzt werden. Zusätzlich wurden 5 µl eines Proteinmarkers zur Bestimmung der Proteingröße in die erste Tasche pipettiert. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt und das Gel wurde laufen gelassen, bis die blaue Lauffront die untere Kante des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend aus der Kammer genommen und für den Western Blot vorbereitet.

Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung

Acrylamid	29,2 % (w/v)
Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
gelöst in H ₂ O bidest.	
Filtriert durch Faltenfilter	
lichtgeschützt aufbewahrt bei 4°C	

Laufpuffer

Tris/HCl (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

2. Material und Methoden

Trenngelpuffer	
Tris/HCL (pH 8,8)	1,5 M

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

Laemmli-Puffer (4X)	
Tris/HCl (pH 6,8)	320 mM
SDS	8 % (w/V)
Glycerin	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	20 % (v/v)
bei -20°C aufbewahrt	

2.6.4 Western Blot

Es wurde die Semi-Dry-Blot-Methode verwendet. Hierfür kam eine Transferkammer zur Anwendung, welche aus einer oberen Kathoden- und einer unteren Anodenplatte bestand. Zuerst wurden das Trenngel vom Sammelgel der SDS-PAGE abgeschnitten und für 20 min in Puffer C (pH 9,0) unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde für 10 min in 20 ml Puffer B (pH 10,5) geschwenkt. Whatman-Papiere wurden mit Puffer A, Puffer B bzw. Puffer C angefeuchtet. Die Anordnung innerhalb der Transferkammer kann der Abb. 2.8 entnommen werden.

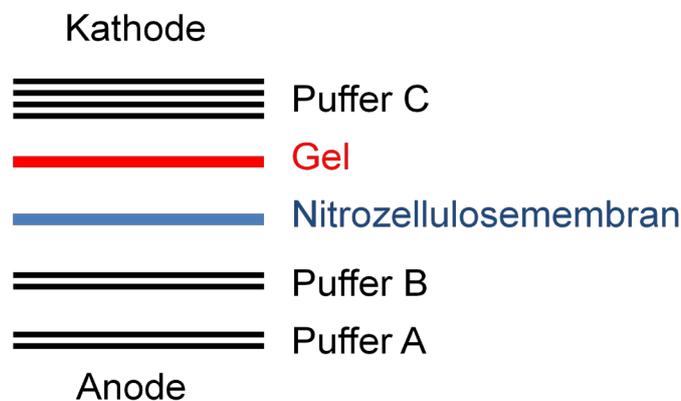


Abb. 2.7: Aufbau der Transferkammer.

2. Material und Methoden

Es musste unbedingt darauf geachtet werden, die einzelnen Schichten blasenfrei aufeinander zu legen. Die Transferkammer wurde geschlossen und für 75 min eine konstante Stromstärke von 75 mA pro Blot angelegt.

Puffer und Lösungen

Laufpuffer

Tris (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
SDS 10 %	0,1 % (v/v)

Puffer A (Anoden Puffer)

Tris	300 mM
Methanol	20 % (v/v)
pH 11,3	

Puffer B (Blot Puffer)

Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
pH 10,5	

Puffer C (Kathoden Puffer)

Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
titriert mit 2 M Borsäure auf pH 9,0	

TBS-T

Tris (pH 8,0)	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

2. Material und Methoden

Blocking-Buffer

Tris (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
SDS 10 %	0,1 % (v/v)

Antikörper Lösung

Trockenmilch	1 % (w/v)
In TBS-T (0,1 %)	

2.6.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte immunologisch mit den entsprechenden Antikörpern. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Nitrocellulosemembran für 1,5 h in 20 ml Blocking-Buffer bei RT inkubiert. Es folgte die Antikörperreaktion mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tab. 2.11) in 10 ml Blocking-Buffer. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend zum Inkubieren über Nacht bei 4°C auf eine Rocky-Plattform gestellt. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T für jeweils 7 min bei RT gewaschen, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Der mit dem ECL-Western-Blot-Analyse-System mitgelieferte sekundäre Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt und die Membran wurde in dieser Verdünnung für 1 h bei RT auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die nicht gebundenen Anteile des sekundären Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils 7 min entfernt. Es folgte die Detektion mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion, bei der die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase die Oxidation von Luminol durch Reduktion von Wasserstoffperoxid bewirkt. Hierbei kann eine Lumineszenz durch Schwärzung eines Röntgenfilmes detektiert werden. Zu diesem Zweck wurde ECL-Entwicklerlösung aus den Lösungen 1 und 2 des ECL-Western-Blot-Analyse-Systems im Verhältnis 1:1 zusammen pipettiert, so dass man 1 ml Entwicklerlösung pro Nitrocellulosemembran erhielt. In der Dunkelkammer wurde die Membran dann für 1 min bei RT in der Entwicklerlösung inkubiert. Die Membran wurde anschließend in Frischhaltefolie luftblasenfrei eingeschlagen und in die Röntgenkassette gelegt. Die Röntgenfilme konnten nun für verschiedene Zeitspannen auf die Membran gelegt werden. Die Zeit richtete sich dabei nach der Qualität des Antikörpers sowie der Menge an aufgetragenem Protein. Zum Entwickeln des Röntgenfilms wurde der Röntgenfilm für 30 bis 60 sec in die Entwicklerlösung, für 2 min in die Fixierlösung und anschließend für 1 min in H₂O gelegt. In einem Trockenschrank wurde der Film schließlich ge-

2. Material und Methoden

trocknet. Zum quantitativen Auswerten wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit der Quantity One Software, Version 4, ausgewertet.

Tab. 2.11: Verdünnung der verwendeten primären Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung
DLK-Antikörper (Kaninchen)	1:3500 in 1 % Trockenmilch in TBS-T
GAPDH-Antikörper (Kaninchen)	1:1000 in 1 % Trockenmilch in TBS-T
SAPK/JNK Antikörper (Kaninchen)	1:1000 in 5 % BSA in TBS-T
Phospho-SAPK/JNK Antikörper (Maus)	1:2000 in 5 % Trockenmilch in TBS-T

2.6.6 Wiederaufbereitung von Nitrocellulosemembranen

Um die geblottete Nitrocellulosemembran mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, musste die Membran vorher von dem Antikörper befreit werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran in 200 mM Glycin-Puffer (pH 2,5) für 30 min inkubiert und anschließend zweimal in TBS-T (0,1 %) gewaschen. Nun konnte mit dem Blocken und der erneuten Antikörperreaktion mit einem weiteren primären Antikörper fortgefahren werden.

2.7. Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung dient dazu, unterschiedliche Kompartimente der Zelle zu isolieren, um somit differenziert die Lokalisation von Proteinen beurteilen zu können. Auf diesem Weg sollte die Verteilung der DLK in unterschiedlichen Zellkompartimenten untersucht werden. Dabei stand die Untersuchung der Auswirkung von TNF- α auf die subzelluläre Lokalisation der DLK im Vordergrund. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurden hierbei zwei unterschiedliche Methoden zur Fraktionierung der Zellen verwendet, welche im Folgenden dargestellt werden.

Zellfraktionierung 1

Diese Methode basiert auf der „differential detergent fractionation“ nach Ramsby et al. (1994) sowie der Extraktion von Kernproteinen nach Schreiber et al. (1989). Es wurden HIT-T15-Zellen auf einer 15-cm-Zellkulturschale ausplattiert und mittels METAFECTENE[®] transient transfiziert. Nach 48 h wurde das Medium abgesaugt und es wurden 10 ml PBS zu den Zel-

2. Material und Methoden

len gegeben. Zum Extrahieren von zellulären Proteinen wurde Digitonin eingesetzt. Digitonin wirkt dabei als Detergenz, welches die Zellmembran perforiert. Es wurden pro 15-cm-Schale 750 µl Digitonin auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 min auf Eis lysiert. Es schloss sich eine Zentrifugation für 1 min bei 16.000 g bei 4°C an. Der Überstand enthielt die zytosolische Fraktion und konnte bei -20°C weggefroren werden. Das Pellet wurde mit 0,3 ml Triton-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, was zu einer Auflösung der zellulären Lipidmembranen führte. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g. Der resultierende Überstand enthielt die Membranproteine, welche keine Bedeutung in der Auswertung spielten. Von größerem Interesse war das Pellet, welches in 50 µl Puffer C für 15 min bei 4°C und 1.400 UpM in einem Schüttelinkubator resuspendiert wurde. Die entstandene Suspension wurde anschließend für 5 min bei 20.000 g bei 4°C zentrifugiert, wobei das resultierende Pellet die Kernfraktion enthielt. Es folgte die quantitative photometrische Proteinbestimmung der gewonnenen Fraktionen (siehe Kap. 2.6.2). Anschließend wurden die gewonnenen Fraktionen mittels Western Blot (siehe Kap. 2.6.4) ausgewertet.

Digitonin-Lösung (4°C)

Digitonin	0,01 % (w/v)
EDTA	1 mM
Protease Inhibitoren	1x (siehe unten)

Triton-Lösung (4°C)

Triton X-100	2 % (w/v)
EDTA	1 mM
Protease Inhibitoren	1 x (siehe unten)

Puffer C (4°C)

HEPES pH 7,9	20 mM
NaCl	400 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM

2. Material und Methoden

Protease Inhibitor Mix (-20°C)	50 x
PMSF	50 mM
Aprotinin	250 µg
Pepstatin	250 µg
Leupeptin	250 µg

Die Protease-Inhibitoren, DTT und PMSF wurden jeweils frisch zu den Lösungen gegeben.

Zellfraktionierung 2

Die Zellen wurden 5 min mit Trypsin inkubiert und anschließend mit 10 ml PBS von der 15-cm-Schale in ein Falcon Plastikröhrchen transferiert. Die Zellen wurden in dem Falcon Plastikröhrchen dreimal mit 10 ml PBS gewaschen und jeweils 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und kurz anzentrifugiert (14000 UpM für 3 sec). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde mit 400 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min zum Quellen stehen gelassen. Anschließend wurden 25 µl des Detergenz Nonidet P 40 10 % (in Puffer A) hinzugegeben und für 5 min bei 8000 UpM abzentrifugiert. Bei dem Überstand handelt es sich um die zytosolische Fraktion der Proteine. Das Sediment wurde vier Mal mit 1 ml Puffer A gewaschen und jeweils bei 800 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das die Kernfraktion enthaltene Sediment wurde in Puffer B über Nacht bei -70°C eingefroren. Nach Wiederauftauen und vortexen wurde die Kernfraktion erneut für 10 min bei -70°C eingefroren. Nach dem Wiederauftauen wurde einmal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurde das Pellet restlos mit Hilfe von Kleenex vorsichtig getrocknet. Im nächsten Schritt wurde zu dem Sediment 50 µl Puffer B gegeben. Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. Daraufhin wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 min bei 14000 UpM abzentrifugiert. Bei dem Überstand handelte es sich um das Kernextrakt. Es folgte die quantitative photometrische Proteinbestimmung der gewonnenen Fraktionen (siehe Kap. 2.6.2). Anschließend wurden die gewonnenen Fraktionen mittels Western Blot (siehe Kap. 2.6.4) ausgewertet.

2. Material und Methoden

Puffer und Lösungen:

Beide Puffer wurden während der Extraktion auf Eis gestellt. Als Detergens wurde 10 % Nonidet P 40 verwendet.

Puffer A (-20°C)

Hepes	10 mM
KCl	10 mM
EGTA	0,1 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1,0 mM
PMSF	0,05 mM
titriert auf pH 7,9	

Puffer B (-20°C)

Hepes	20 mM
NaCl	400 mM
EGTA	1,0 mM
EDTA	1,0 mM
DTT	1,0 mM
PMSF	0,05 mM
titriert auf pH 7,9	

Die Protease-Inhibitoren, DTT und PMSF wurden jeweils frisch zu den Lösungen gegeben.

2.8 Luciferase-Reportergen-Assay

Das Enzym Luciferase stammt aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*). Der Luciferase-Assay dient zur Quantifizierung von Promotoraktivität. Hierbei wird die Aktivität der Luciferase, welche unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors exprimiert wird, durch Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin quantitativ in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Die Lichtproduktion ist dabei proportional zur Luciferasemenge (de Wet et al. 1987). Das emittierte Licht besitzt eine Wellenlänge von 560 nm und kann in einem Luminometer gemessen werden.

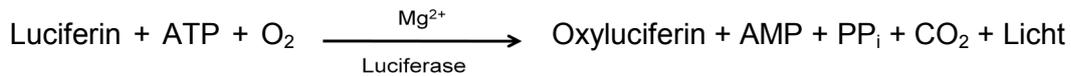


Abb. 2.8: Reaktionsgleichung der Luciferasereaktion.

2.8.1 Präparation der Zellextrakte

Für den Luciferase-Reportergen-Assay wurden die HIT-Zellen einer konfluent bewachsenen 15-cm-Zellkulturschale auf zehn 6-cm-Schalen ausplattiert und anschließend entsprechend mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Wenn angegeben, wurde 6 h vor dem Ernten mit 100 µl 2 M KCl depolarisiert (Endkonzentration 40 mM). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 1,5 ml Kratzpuffer auf die Zellen gegeben. Sie wurden mit einem Gummizellschaber gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 6000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 150 µl kaltem Kaliumphosphat-Puffer (mit 1 mM DTT frisch versetzt) resuspendiert. Danach wurden die Zellen durch dreimaliges Gefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad lysiert. Nach dem Lysieren der Zellen wurde das Zelllysate durch Abzentrifugieren mit 14.000 UpM für 3 min bei 4°C von den Zelltrümmern im Bodensatz befreit. Der Überstand mit dem Zellextrakt konnte nun für die Luciferase Messung und die GFPtpz-Bestimmung benutzt werden.

Puffer und Lösungen

Kratzpuffer

NaCl	150 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
Tris (pH 7,5)	40 mM
gelöst in H ₂ O bidest.	
titriert auf pH 7,6	

2. Material und Methoden

Kaliumphosphat-Puffer

K ₂ HPO ₄	100 mM
KH ₂ PO ₄	100 mM
gegeneinander auf pH 7,8 titriert	

Glycyglycin-Puffer (4°C)

Glycyglycin (pH 7,8)	25 mM
MgSO ₄	15 mM
EGTA (pH 8,0)	4 mM
gelöst in H ₂ O	
titriert auf pH 7,8	

Luciferin-Stock (-80°C)

DTT	10 mM
Luciferin	1 mM
gelöst in Glycyglycin-Puffer	

Luciferase-Assay-Mix

für 24 Messproben

Glycyglycin-Puffer	7,5 ml
Kaliumphosphatpuffer	1,5 ml
ATP (200 mM)	100 µl
DTT (1 M)	10 µl

Luciferin-Mix

für 24 Messproben

Glycyglycin-Puffer	5,6 ml
Luciferin Stock	1,5 ml
DTT (1 M)	56 µl

2.8.2 Messung der Luciferase-Aktivität

Für die Luciferase-Aktivitätsmessung wurden 50 µl des Zellextraktes und 368 µl Luciferase-Assay-Mix in ein Luminometer-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde das Luminometer-Röhrchen zusammen mit dem Luciferin-Mix in dem Luminometer platziert. Bei der Messung

wurde durch automatische Zugabe von 200 µl Luciferin-Mix die Reaktion gestartet und das Gerät detektierte die Lichtemission bei 560 nm über ein Zeitintervall von 20 sec. Die Messwerte lieferte das Gerät in relativen Lichteinheiten (RLU), welche als indirektes Maß für die transkriptionelle Aktivität des untersuchten Genpromotors angesehen werden konnten.

2.8.3 GFPtpz-Messung

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz bei den Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde das Green-Fluorescent-Protein (pGFPtpz-cmv), unter der Kontrolle des CMV-Promotors, kotransfiziert. Es handelt sich dabei um eine Mutante des GFP Wildtyps aus der Qualle *Aequoria victoria*. Es kann angenommen werden, dass intakte Zellen bei einer Transfektion alle Plasmide mit gleicher Wahrscheinlichkeit aufnehmen (Reid & Flynn 1997). Die emittierte Fluoreszenz, die proportional zur GFP Menge innerhalb der Zellen ist, kann mit einem Fluorometer quantitativ bestimmt werden.

Durchführung

Für die Fluoreszenzmessung von GFP wurden jeweils 50 µl des Zellextraktes in eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und mit Hilfe des Fluorometers Fusion (Canberra-Packard) gemessen. Als Leerwert wurden 50 µl Kaliumphosphatpuffer pipettiert. GFP wurde hierbei durch Licht der Wellenlänge $\lambda=485$ nm angeregt und emittierte Licht mit der Wellenlänge $\lambda=530$ nm. Die Anregung und Messung des emittierten Lichtes erfolgte über eine Sekunde. Das Gerät lieferte Messwerte in Fluoreszenzeinheiten (RFU), die Aufschluss über die Effizienz der Transfektion geben konnten.

2.9 Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie bedient man sich der Antigen-Antikörper-Reaktion, um die Expression und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen. Hierbei bindet ein spezifischer primärer Antikörper an einem spezifischen Epitop (bestehend aus mindestens 5 AS) innerhalb eines Proteins. Somit ist der primäre Antikörper verantwortlich für die Spezifität der Untersuchung. Bei der hier verwendeten indirekten Immunzytochemie benutzt man einen zusätzlichen sekundären Antikörper, welcher aus einer anderen Spezies stammt und gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieser sekundäre Antikörper ist an ein Fluorochrom ge-

koppelt, das durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht mit definierter Wellenlänge emittiert. Dieses Licht kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

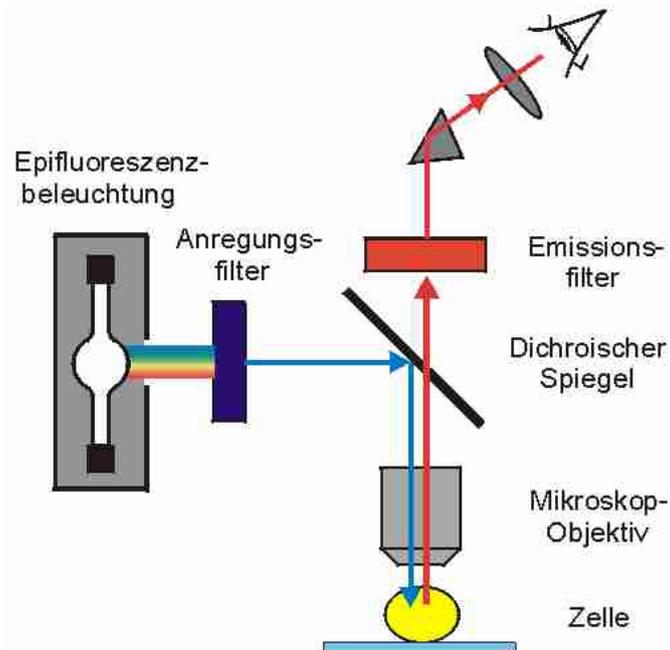


Abb. 2.9: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops (nach Frings S. & Baumann A. Institut für Zoologie, Universität Heidelberg <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/epifluol.jpg>)

2.9.1 Immunzytochemische Färbung

HIT-T15-Zellen einer konfluent bewachsenen 15-cm-Zellkulturschale wurden auf Deckgläschen in 6-well-Platten ausplattiert. Um eine optimale Dichte der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie zu erhalten, sollte pro Vertiefung eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen erreicht werden. Je nach Fragestellung erfolgten eine transiente Transfektion von 2 μg DNA mittels METAFECTENE[®] (DLKwt, DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK NLS Doppel, pBS bzw. GFPwt oder GFP-NLS) und eine anschließende Inkubation für 48 h. Je nach Versuch erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten vor dem Ernten eine Behandlung mit TNF- α , Il-1 β (Konzentration 10 ng/ml) bzw. 90 min vor dem Ernten eine Behandlung mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (25 $\mu\text{mol/l}$) (siehe Kap. 3.1.1, 3.1.2 und 3.2.3). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die mit HIT-T15-Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in neue 6-well-Platten überführt und mit PBS für 5 min gewaschen. Das Waschen erfolgte hierbei stets auf einer Schüttelplattform. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit jeweils 4 ml -20°C-kaltem Methanol für 10 min fixiert. Hiernach wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 min mit 4 ml PBS gewaschen. Unspezifische Proteinbindungen wurden im nächsten Schritt durch eine 5-

2. Material und Methoden

minütige Inkubation mit 4 ml 0,1 %igem Natriumborhydrid abgeblockt. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um die restlichen unspezifischen Bindungen zu blocken, folgte eine Inkubation für 45 min bei RT mit dem Block-Puffer, bevor die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden. Danach erfolgte in einer 15-cm Zellkulturschale bei 4°C über Nacht die eigentliche Inkubation mit dem primären Antikörper auf Parafilm (Konzentrationen der jeweiligen Antikörper siehe Puffer und Lösungen). Am folgenden Tag wurden die Zellen zuerst dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit dem sekundären Antikörper RT inkubiert. Dieser und die folgenden Schritte erfolgten lichtgeschützt in Aluminiumfolie. Hiernach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es schloss sich die 10-minütige Inkubation für die Kernfärbung mit jeweils 13 µl Vectashield® mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) an. Bei DAPI handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA, und somit zur Markierung des Kerns, eingesetzt wird. Luftdicht fixiert wurden die Deckgläschen auf den Objektträgern mit handelsüblichem Nagellack (bestehend aus Nitrocellulose).

Puffer und Lösungen

Natriumborhydrid-Lösung 0,1 %	0,05 g Natriumborhydrid in 50 ml PBS
PBS-Puffer	Siehe Kap. 2.3 Zellkultur
Bovine Serum Albumine (BSA) 1 %	0,015 g BSA in 1500 µl PBS
Block-Puffer	10 % Pferdeserum und 1 % BSA in PBS
Methanol 100 %	bei -20°C
Primäre Antikörper	
a.) Cleaved Caspase-3 Antibody (Kaninchen)	Verdünnung 1 : 50 in 1 % BSA in PBS
b.) Anti-Flag® M2 Monoclonal Antibody (Maus)	Verdünnung 1:2000 in 1 % BSA in PBS
c.) DLK-Antikörper (Kaninchen)	Verdünnung 1:50 in 1 % BSA in PBS
Sekundäre Antikörper	
a.) Alexa Fluor® 488-labeled Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Absorptionsmaximum bei 495 nm, Emissionswellenlänge 519 nm (grün); Verdünnung 1:50 in 1 % BSA in PBS
b.) Tetramethylrhodamine-labeled Goat Anti-Mouse IgG Antibody	Absorptionsmaximum bei 555 nm, Emissionswellenlänge 580 nm (rot); Verdünnung 1:200 in 1 % BSA in PBS
Vectashield® mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol)	Stammlösung 1 mg/ml; Absorptionsmaximum 372 nm; Emissionswellenlänge 456 nm (blau)

2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen konnten nun unter dem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit 63-facher Vergrößerung und der angeschlossenen Openlap 3.1 Imaging Software betrachtet werden, wobei die Abbildungen der Zellen digitalisiert und ausgewertet werden konnten. Die Anregungs- sowie die Emissionswellenlängen der fluoreszierenden Proteine am sekundären Antikörper sind unter Puffer und Lösungen einzusehen. Es wurden von jedem Deckgläschen stets zehn zufällig ausgewählte Bildausschnitte fotografiert. In jedem Bildausschnitt befanden sich je nach Dichte der Zellen ca. 20 - 30 Zellen. Bei jedem Experiment (Doppelbestimmung und dreimaliger Wiederholung; n=6) wurden somit 1200 – 1800 Zellen betrachtet. Bei der Analyse der überexprimierten DLK gingen im Gegensatz zur Betrachtung der endogenen DLK nur die transfizierten HIT-T15 Zellen (siehe Kap. 2.5) in das Ergebnis mit ein.

Bei den Versuchen kam unter anderem der Expressionsvektor pFlag-DLKwt zum Einsatz, welcher eine N-terminale Erkennungsstruktur (FLAG) trägt (siehe Kap. 2.2.7). Um die Auswirkung der DLK-Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 auf die Apoptoserate der HIT-T15 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit der entsprechenden DLK-Mutante transfiziert und sowohl mit dem Anti-FLAG® M2 Monoclonal Antibody als auch mit dem Cleaved Caspase-3 Antibody einer Doppelfärbung unterzogen. Von Interesse war hierbei, wie viel Prozent der Gesamtheit der transfizierten Zellen cleaved-Caspase-3-positiv waren. Dieser ermittelte Quotient (Angaben in Prozent) gibt Aufschluss über die Apoptoserate in den mit den entsprechenden DLK-Mutanten transfizierten Zellen. Um die Apoptoserate zu ermitteln, wurden wiederum 10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte fotografiert und ausgezählt.

2.10 Immunogold-Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie lassen sich Proteine ultrastrukturell sichtbar machen. Dies ermöglicht die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen. Hierzu wurde die Darstellung der HIT-T15 Zellen in der Immunogold-Elektronenmikroskopie etabliert. Es wurden ein primärer Antikörper, der gegen ein Epitop auf dem Zielprotein gerichtet ist sowie ein sekundärer, an Gold gekoppelter Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper stammt aus einer anderen Spezies und ist gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet. Die an diesen gekoppelten Goldkugeln lassen sich mit dem Elektronenmikroskop darstellen. Die Antikörperreaktion wurde nach der post-embedding Methode durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei zuerst eingebettet, die Blöcke geschnitten und anschließend

einer Antikörperbehandlung unterzogen. Hierdurch sind die Strukturen im Zellinneren für den Antikörper zugänglich. Goldpartikel lassen sich auf der Oberfläche mit Proteinen beladen. Die Beladung basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen und ist deshalb pH-abhängig. Für Immunglobuline empfiehlt sich ein pH-Wert von 7,4 (Pingoud & Urbanke 1997). Die Einbettung erfolgte mit LR-Gold, einem hydrophilen Acrylat, welches sich durch UV-Licht und chemische Katalysatoren aushärten lässt. Dieses ist für die Nachweisbarkeit von antigenen Strukturen besser geeignet als das herkömmliche Epoxid-Harz. Jedoch führen diese hydrophilen Acrylate zu einem Verlust von morphologischen Details (Migheli et al. 1992). Die Polymerisation der Acrylate ist eine exotherm verlaufende Reaktion, bei der es zu Bildung von Gasblasen innerhalb des Einbettmediums kommt. Die Wahl der Temperatur sowie die Lokalisation der Lichtquelle spielten bei der Einbettung somit eine wesentliche Rolle. Je niedriger die Temperatur und je größer die Entfernung der Lichtquelle zu den Präparaten, desto geringer die Exothermie und damit die Gefahr ungleichmäßig polymerisierten Kunststoffes. Jedoch sinkt bei niedrigen Temperaturen auch die Polymerisationsgeschwindigkeit (Schumann 2004).

2.10.1 Herstellung von kolloidalem Gold

Um eine Größe der Goldkügelchen von 20 nm zu erreichen, wurde zunächst 0,5 ml 1 %iges Tetrachlorogoldsäure mit 49,5 ml Aqua dest. in einem sauberen Kolben mit Rückflusskühler gekocht. Nach Erreichen der Siedetemperatur wurde 1 ml 1 %iges Tri-Natrium-citrat-dihydrat zugegeben. Es musste darauf geachtet werden, dass die Lösung weiter kocht. Während des Kochens veränderte sich die Farbe der Lösung von gelb > blau > violett > rot > kirschrot. Nach 5 min sollte die Lösung die kirschrote Farbe erreichen und klar sein. Die entstandenen Goldkugeln wurden durch Zugabe von 0,2 M K_2CO_3 auf den pH-Wert 9,0 eingestellt.

2.10.2 Antikörper koppeln

Um das optimale Verhältnis zwischen Immunglobulin und daran zu koppelndem Gold zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Hierzu wurde der sekundäre Antikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse) 1:100 mit Aqua dest. pH 9,0 verdünnt. Hiervon wurden Volumina von 10 – 200 μ l mit jeweils 100 μ l gekochter Goldlösung versetzt, vorsichtig gemischt und 2 min gewartet, damit sich der Antikörper an das Gold anlagern konnte. Anschließend wurde jeweils 100 μ l 10 %iges NaCl hinzugegeben. Ungekoppeltes kolloidales Gold ist sehr empfindlich und fällt schnell aus. Bei unzureichender Menge an Antikörpern kommt es daher zu

einer Farbänderung von rosa zu blau. Die Menge des Antikörpers der Verdünnungsreihe, welche gerade keinen Farbumschlag nach sich zieht, ist die Menge an Antikörper, um 100 μ l Gold zu koppeln. Zum eigentlichen Koppeln des sekundären Antikörpers wurde das Zehnfache der ermittelten Antikörpermenge 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und mit 1000 μ l Goldlösung in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde $1/10$ des Gesamtvolumens 10 %iges PBS-BSA pH 9,0 hinzugefügt und mit 1 %igem PBS-BSA pH 9,0 auf 1700 μ l aufgefüllt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde für 20 min mit 10000 UpM zentrifugiert und für weitere 10 min stehen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment 1:10 mit einer Hälfte 1 % PBS-BSA pH 9,0 und zur anderen Hälfte 1 % PBS-BSA pH 7,5 verdünnt. Der gekoppelte Antikörper ist somit bei 4°C für 2 Wochen haltbar. Da die Qualität des Antikörpers mit dem Alter abnimmt, sollte in der ersten Woche nach der Herstellung eine Verdünnung von 1:300 und in der zweiten Woche eine Verdünnung von 1:200 verwendet werden.

2.10.3 Ausplattierung und Transfektion

Die Zellen wurden in 96-well Plates mit flachem Boden ausplattiert und mit METAFECTENE[®] transient transfiziert. Um die optimale Zelldichte für die Elektronenmikroskopie zu ermitteln, wurden mehrere Verdünnungen ausprobiert. Die optimale Zellmenge zeigte sich nach mikroskopischer Betrachtung bei 2×10^5 Zellen pro Well. Auf einer 15 cm Platte befinden sich bei konfluentem Wachstum 30×10^6 Zellen. Diese wurden in 30 ml Medium aufgenommen. Pro Well wurden folglich 200 μ l der Zellsuspension eingesetzt. 48 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF- α für 60 min behandelt und anschließend eingebettet.

2.10.4 Präparation und Fixierung

Vor dem eigentlichen Arbeitsschritt wurde 8 %iges Paraformaldehyd zum Fixieren hergestellt. Dabei ist wichtig zu betonen, dass hierbei streng unter dem Abzug gearbeitet wurde. 8 g Paraformaldehyd wurden mit 100 ml Aqua bidest. in einen großen Erlenmeyerkolben gegeben und mit Alufolie verschlossen. Die Lösung wurde anschließend für 60 min bei 60°C – 70°C unter ständigem Rühren erwärmt. Hiernach wurden 1 bis 3 Tropfen 1 N NaOH langsam, bis die Lösung klar war, dazu gegeben. Nach Abkühlen der Lösung wurde sie filtriert. Es wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert bei 7,4 lag.

Die Zellen wurden in der 96-well-Platte mit 200 µl 0,15 M Sörensen gewaschen und anschließend mit 200 µl Fixierer für 15 min bei 4°C fixiert. Die Waschschriffe erfolgten im Folgenden jeweils mit 0,15 M Sörensen für 5 min bei 4°C. Nach einmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit 10 mM NH₄Cl-Lösung (in 0,15 M Sörensen) für 20 min bei 4°C. Es folgten zwei weitere Waschschriffe. Hiernach wurden die Zellen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 30, 50 und 70 % Ethanol für jeweils 5 min dehydriert. Nun schloss sich die Einbettung der Zellen in LR-Gold an. Zuerst wurden die Zellen in purem LR-Gold für 30 min bei 4°C inkubiert. Das LR-Gold wurde anschließend mit einer Pipette vorsichtig abgezogen. Im Anschluss wurde auf die Zellen LR-Gold mit 0,8%-Beschleuniger gegeben und für 16 h über Nacht bei – 20°C inkubiert. Zum Aushärten wurde anschließend das LR-Gold mit Beschleuniger gewechselt und bis über den Rand hinweg aufgefüllt. Die 96-well Platte wurde luftdicht mit Folie verschlossen und in eine Mikrotomkammer bei – 20°C für weitere 16 h mit UV-Licht zum Aushärten gebracht. Um die fertig eingebetteten Zellen aus dem Plastik herauszulösen, wurde die 96-well Platte in Xylol eingelegt. Hierbei löste sich das Plastik ab und die in LR-Gold eingebetteten Zellblöcke wurden zugänglich.

2.10.5 Mikrotom

Von den gewonnenen Blöcken wurden mit Hilfe eines Reichert-Jung Ultracut E und einem Diamantenmesser Semidünnschnitte von 1 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht, getrocknet und mit Richardson-Blau-Lösung für 10 Sekunden auf einer Heizplatte gefärbt. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop angeschaut und dienten der Orientierung innerhalb des Zellblockes, um eine Stelle zu identifizieren, an der eine möglichst große Anzahl an Zellen lag. Hatte man eine ausreichende Anzahl von Zellen unter dem Mikroskop gefunden, so konnte der geschnittene Block zum Ultradünnschneiden weiterverwendet werden und gezielt mit einer Rasierklinge getrimmt werden. Anschließend wurden die 90 – 150 nm dicken Ultradünn-Schnitte der HIT-Zellen mit dem Diamantenmesser angefertigt. Ein mit Wasser gefüllter Trog im Messerblock nahm die fertigen Schnitte auf der Wasseroberfläche auf. Von dort konnten die entstandenen Schnitte auf die Formvarbeschichteten (0,3 % Formvar gelöst in Chloroform) Nickelgrids überführt werden.

2.10.6 Antikörperreaktion und Kontrastierung

Eine 15 cm Schale wurde mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Weise, je nach Versuch, mit PBS verdünnt. Es wurden verschiedene Verdünnungen der verwendeten Antikörper in Vorversuchen ausgetestet. Für die verwendeten Verdünnungen der beiden primären Antikörper siehe Tab. 2.12. Zur Detektion der endogenen DLK wurde der Anti-DLK Antikörper eingesetzt, während der Anti-Flag® M2 Monoclonal Antikörper bei Versuchen mit überexprimierter DLKwt bzw. DLK K185A Verwendung fand. Pro Grid wurden 20 µl des verdünnten primären Antikörpers nebeneinander auf Parafilm pipettiert. Danach wurde der Grid mit dem Ultradünnschnitt mit einer krummen Pinzette auf den Tropfen gelegt. Die Schale wurde abgedeckt und für die geforderte Zeit bei entsprechender Temperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Grid mit einer Pinzette über einen Messbecher gehalten und mit filtriertem PBS (100 ml) abgespült. Es sollte dabei darauf geachtet werden, dass der Grid selber nicht abgespült wird, sondern das PBS über die Pinzette auf den Grid läuft. Der bereits 1:10 verdünnte Antikörper wurde mit PBS-BSA 1 % pH 7,4 auf 1:300 verdünnt. 20 µl des sekundären Antikörpers wurden auf das Parafilm pipettiert. Der Grid wurde auf den Tropfen des sekundären Antikörpers gelegt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin schloss sich die Kontrastierung der Schnitte an. Hierbei wurden die Schnitte sowohl positiv mit Uranylacetat als auch negativ mit Bleicitrat kontrastiert. Beim Positiv-Kontrastieren wird Kontrastmittel an vorhandene Strukturen angelagert. Die Negativkontrastierung betont die Ränder der Zellen, da sich das Kontrastmittel um die Objekte herum anlagert. Bei Uranylacetat handelt es sich um einen schwach radioaktiven Stoff. Es musste deshalb unbedingt mit Handschuhen gearbeitet werden. Es wurde jeweils ein Tropfen von 20 µl 1%iges Uranylacetat auf Parafilm gegeben und die Grids für 10 min darauf gelegt. Hiernach wurden die Schnitte mit 100 ml Aqua dest. pro Grid gewaschen und anschließend für weitere 10 min auf Bleicitrat gelegt. Ein gründlicher Waschschrift mit 300 ml und anschließender Trocknung mit Filterpapier schloss sich an. Die kontrastierten Grids wurden in eine Box gelegt und konnten für die Elektronenmikroskopie verwendet werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte immer nach rechts zeigten, um die Orientierung für das Elektronenmikroskop zu wahren.

Tab. 2.12: verwendete Antikörper für die Elektronenmikroskopie

Primärer Antikörper	Anwendung
DLK-Antikörper (Kaninchen)	1:50 in PBS-BSA 1 %, pH 7,4, 1 h RT
Anti-Flag® M2 monoklonal	1:100 in PBS-BSA 1 %, pH 7,4, ü.N. RT

2. Material und Methoden

2.10.7 Mikroskopieren und Bearbeitung der Bilder

Zum Mikroskopieren wurde je nach Verfügbarkeit einerseits das Elektronenmikroskop Zeiss Leo906E der Abteilung Anatomie und Zellbiologie für die Vorversuche und andererseits das Elektronenmikroskop Zeiss EM 10 der Abteilung Neuropathologie für den Hauptversuch verwendet. Zum Bearbeiten der Bilder wurde der Adobe Photoshop® CS2, Version 9.0 verwendet.

Puffer und Lösungen:

Fixans

Paraformaldehyd (8 %)	4 % (v/v)
Glutaraldehyd (25 %)	0,5 % (v/v)
Sörensen	0,15 M
pH 7,4	
200 µl pro well	

0,3 M Sörensen-Puffer

Vor Gebrauch Lösung A und B miteinander mischen
18,2 ml Lösung A + 81,8 ml Lösung B

Lösung A

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	41,37 g
Aqua tridest.	1 l
bei 4°C lagern	

Lösung B

Na_2HPO_4	42,58 g
Aqua tridest.	1 l
bei RT lagern	

Richardson-Blau

Azur II	1 % (w/v)
Methylenblau	2 % (w/v)
Borax	2 % (w/v)
gelöst in aqua dest. und filtriert	

2.11 Auswertung und Statistik

Zur quantitativen Auswertung von Röntgenfilmen diente die Quantity One Software, Version 4 (Bio-Rad, München). Für die Aufnahmen der Bilder am Fluoreszenzmikroskop wurde die Openlap 3.1 Imaging Software (Improvision, Tübingen) verwendet. Die Bilder der Immunfluoreszenz sowie der Elektronenmikroskopie wurden mit Hilfe von CoreIDRAW[®] X3, Version 13.0, und Adobe Photoshop[®] CS2, Version 9.0, ausgewertet.

Die Ergebnisse in Kapitel 3 zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes ($SEM = SE/\sqrt{n}$) der einzelnen Messwerte. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von SigmaPlot, Version 11.0, erstellt. Die Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde mit Hilfe des gepaarten Student t-Test mit der Software Microsoft[®] Excel ermittelt. Bei Experimenten mit mehr als zwei Gruppen wurde eine ANOVA Analyse mit STATISTICA[®], Version 7.0, angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Subzelluläre Lokalisation der DLK in der Beta-Zelllinie HIT-T15

Die folgenden Ergebnisse sollen der Klärung der subzellulären Lokalisation der DLK in der insulinproduzierenden Beta-Zelllinie HIT-T15 dienen.

3.1.1 Lokalisation der DLK und deren Beeinflussung durch TNF- α und IL-1 β

Die subzelluläre Lokalisation der endogenen DLK wurde mit Hilfe der Immunzytochemie in der insulinproduzierenden Beta-Zelllinie HIT-T15 untersucht. Dabei wurden HIT-T15 Zellen ausplattiert, 48 h inkubiert und immunzytochemisch mit dem DLK-Antikörper und DAPI gefärbt. Pro Bildausschnitt wurden Bildserien mit jeweils einer Anti-DLK Färbung, einem Durchlichtbild, einer Kernfärbung (DAPI) sowie einem Überlagerungsbild aufgenommen. Die Auswertung dieses Versuches zeigte, dass die DLK unter basalen Bedingungen eine vorwiegende zytoplasmatische Lokalisation einnimmt (siehe Abb. 3.1 A). Zusätzlich sollte der Einfluss von Zytokinen untersucht werden. Es kamen dabei die in die Pathogenese des Diabetes mellitus involvierten Zytokine TNF- α und IL-1 β zum Einsatz. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in unterschiedlichen Zeitabständen für 10, 30 oder 60 min vor dem Ernten mit 10 ng/ml TNF- α bzw. IL-1 β behandelt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Nach der Behandlung mit TNF- α kam es zeitabhängig zu einer Akkumulation von DLK im Zellkern (Abb. 3.1 B). Gleiche Befunde konnten durch den Einsatz von IL-1 β erhoben werden.

3. Ergebnisse

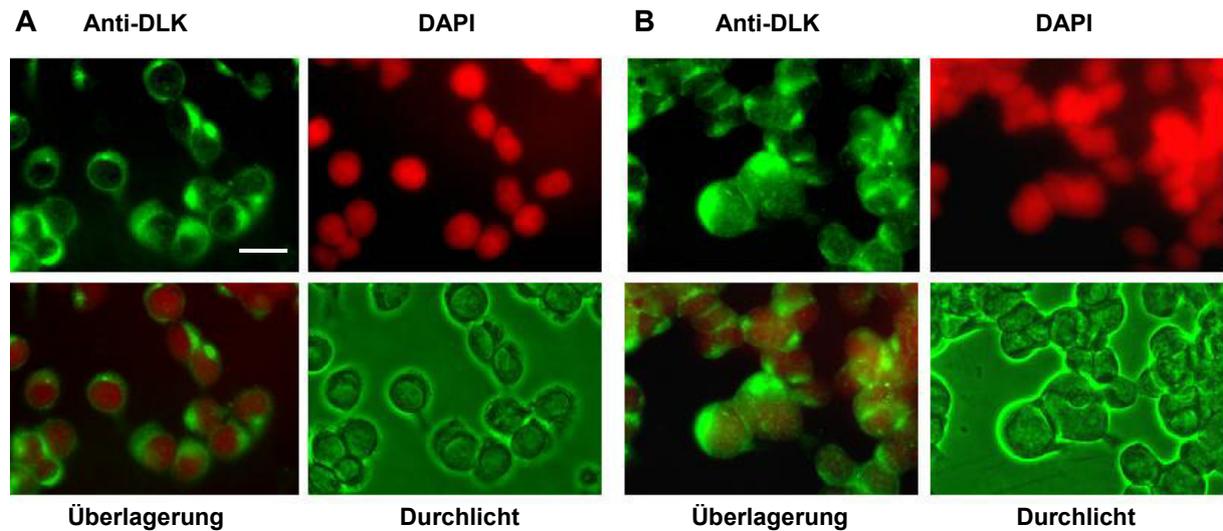


Abb. 3.1: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HIT-Zellen (jeweils identische Bildausschnitte) **A** zeigt HIT-Zellen ohne Behandlung. Oben links ist die Anti-DLK Färbung gezeigt. Die DLK ist hier weitestgehend im Zytosol lokalisiert. Desweiteren ist eine Kernfärbung mittels DAPI, hier rot dargestellt, ein Überlagerungsbild sowie ein Durchlichtbild der Zellen dargestellt. **B** Bildserie von HIT-Zellen nach Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml, 60 min). Der weiße Balken entspricht 20 μ m.

Die Auswertung dieses Versuches basierte auf der Grundlage einer Graduierung, welche den Grad der nukleären DLK-Lokalisation in verschiedene Stadien zusammenfasste. Diese Graduierung diente der qualitativen Ergebnissicherung bei der Beurteilung der subzellulären Verteilung der DLK in den HIT-Zellen. Die Einteilung der Lokalisation erfolgte nach dem in Abb. 3.2 dargestellten Score in vier Stadien. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass sich die DLK unterschiedlich stark im Kern nachweisen lässt.

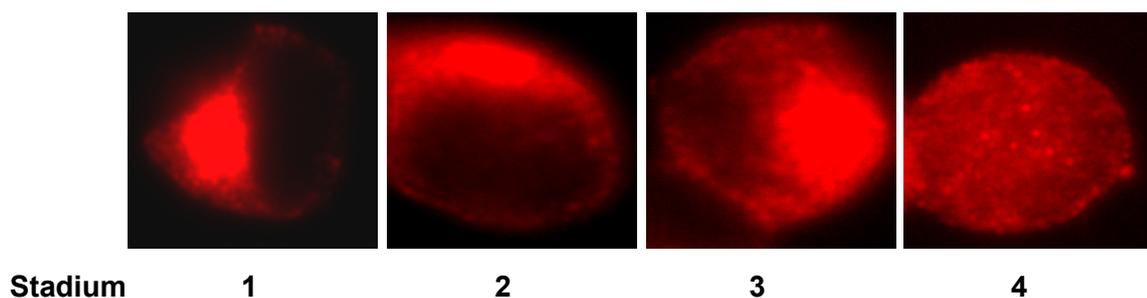


Abb. 3.2: Score zur Beurteilung der subzellulären Lokalisation der DLK in HIT-Zellen (abgewandelt von S.Börchers, unveröffentlichte Daten aus der Abteilung).

Stadium 1: DLK ausschließlich im Zytosol lokalisiert, Kern frei von DLK

Stadium 2: DLK hauptsächlich im Zytosol lokalisiert, vereinzelt im Kern

Stadium 3: DLK deutlich nukleär lokalisiert

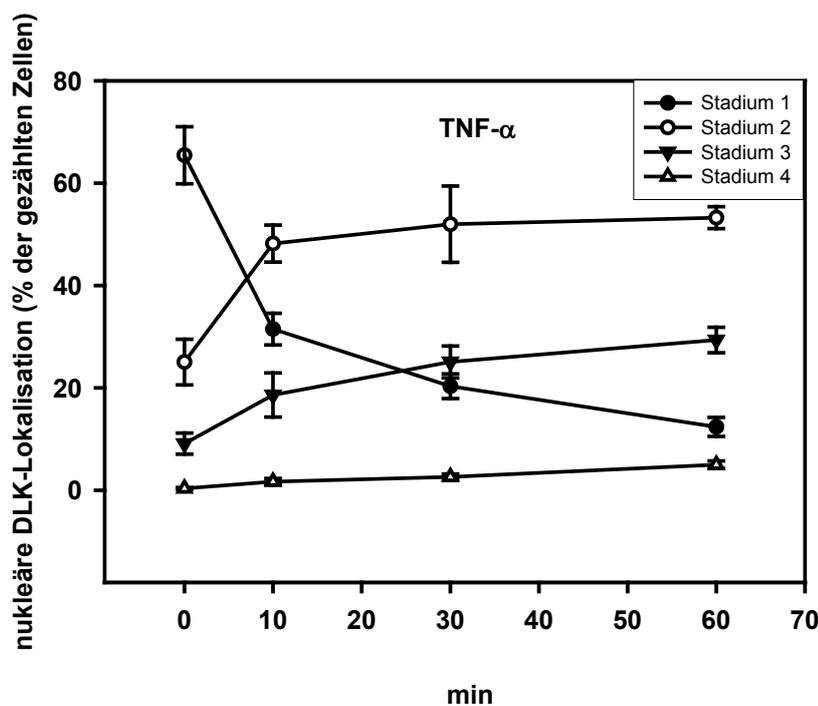
Stadium 4: DLK gleichermaßen stark in Zytosol und Kern lokalisiert.

Durch die Auswertung des oben dargestellten Versuches mit Hilfe des vorgestellten Scores wurde zusätzlich ein quantitatives Ergebnis erzielt, welches das Ausmaß der nukleären DLK-

3. Ergebnisse

Lokalisation skizzierte. Die Inkubation der HIT-Zellen mit den Zytokinen TNF- α bzw. IL-1 β führte zu einer Zunahme der DLK im Zellkern. Der Abb. 3.3 kann entnommen werden, dass es sich bei der Änderung der Lokalisation um eine leichte Akkumulation der DLK im Kern handelt. Dieser Aspekt wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die Mehrheit der Zellen in denen die DLK im Kern detektiert werden konnte, nur leichte DLK Akkumulation im Kern (Stadium 2) aufweisen. Nach Behandlung mit TNF- α für 60 min stieg der Anteil aller Zellen im Stadium 2 von 25,05 % \pm 10,94 auf 53,26 % \pm 5,25, nach Behandlung mit IL-1 β für 60 min von 21,48 % \pm 11,60 auf 50,05 % \pm 4,26. In diesem Stadium war der Großteil der DLK noch im Zytoplasma lokalisiert. Herauszuheben ist jedoch, dass die DLK durch die Behandlung mit den beiden Zytokinen TNF- α und IL-1 β vermehrt im Kern nachgewiesen werden konnte. Eine deutliche nukleäre DLK-Lokalisation wird durch Stadium 3 definiert. Eine 60-minütige TNF- α -Behandlung führte zu einer Steigerung des Anteils von Zellen in diesem Stadium von 9,12 % \pm 2,01 auf 29,36 % \pm 2,49. Ebenfalls kam es zu einer Zunahme von Zellen in Stadium 3 nach Behandlung mit IL-1 β von 10,20 % \pm 3,00 auf 26,31 % \pm 2,50. Der Anteil von Zellen mit einer besonders ausgeprägte Kernlokalisierung der DLK (Stadium 4) konnte weder durch Inkubation mit TNF- α noch durch IL-1 β wesentlich erhöht werden. Zusammenfassend kann den Daten entnommen werden, dass es durch Behandlung mit TNF- α bzw. IL-1 β zu einer Akkumulation der DLK im Kern, jedoch keinesfalls zu einer vollständigen Translokation der gesamten zellulären DLK kam.

A



B

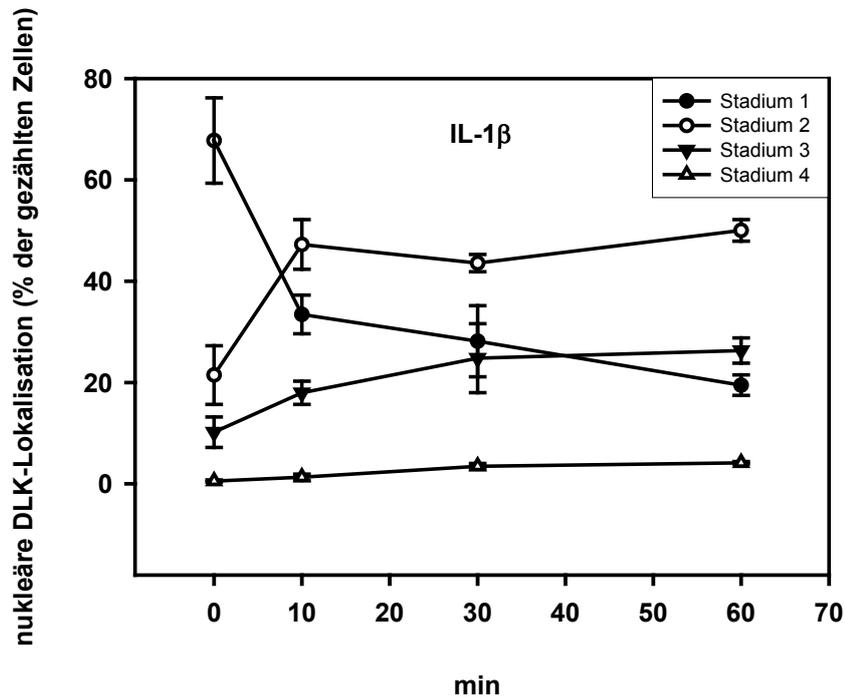


Abb. 3.3: Immunfluoreszenzmikroskopische Differenzierung der DLK-Lokalisation in vier Stadien. Behandlung von HIT-Zellen mit TNF- α (A) bzw. IL-1 β (B) in einer Konzentration von jeweils 10 ng/ml. Die Definition der verwendeten Stadien findet sich in Abb. 3.2. Auf der Abszisse ist die Behandlungszeit mit dem jeweiligen Zytokin in Minuten (Behandlungszeit 10, 30, 60 min) aufgetragen. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, bei denen die DLK im Kern detektierbar war. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

Eine zusammenfassende Darstellung der erhobenen Daten wird durch die Abb. 3.4 repräsentiert. Sie gibt den prozentualen Anteil aller Zellen wieder, bei denen DLK im Kern detektierbar war. Es kann daraus entnommen werden, dass es abhängig von der Behandlungszeit mit TNF- α (A) bzw. IL-1 β (B) zu einer Translokation der DLK in den Kern kam.

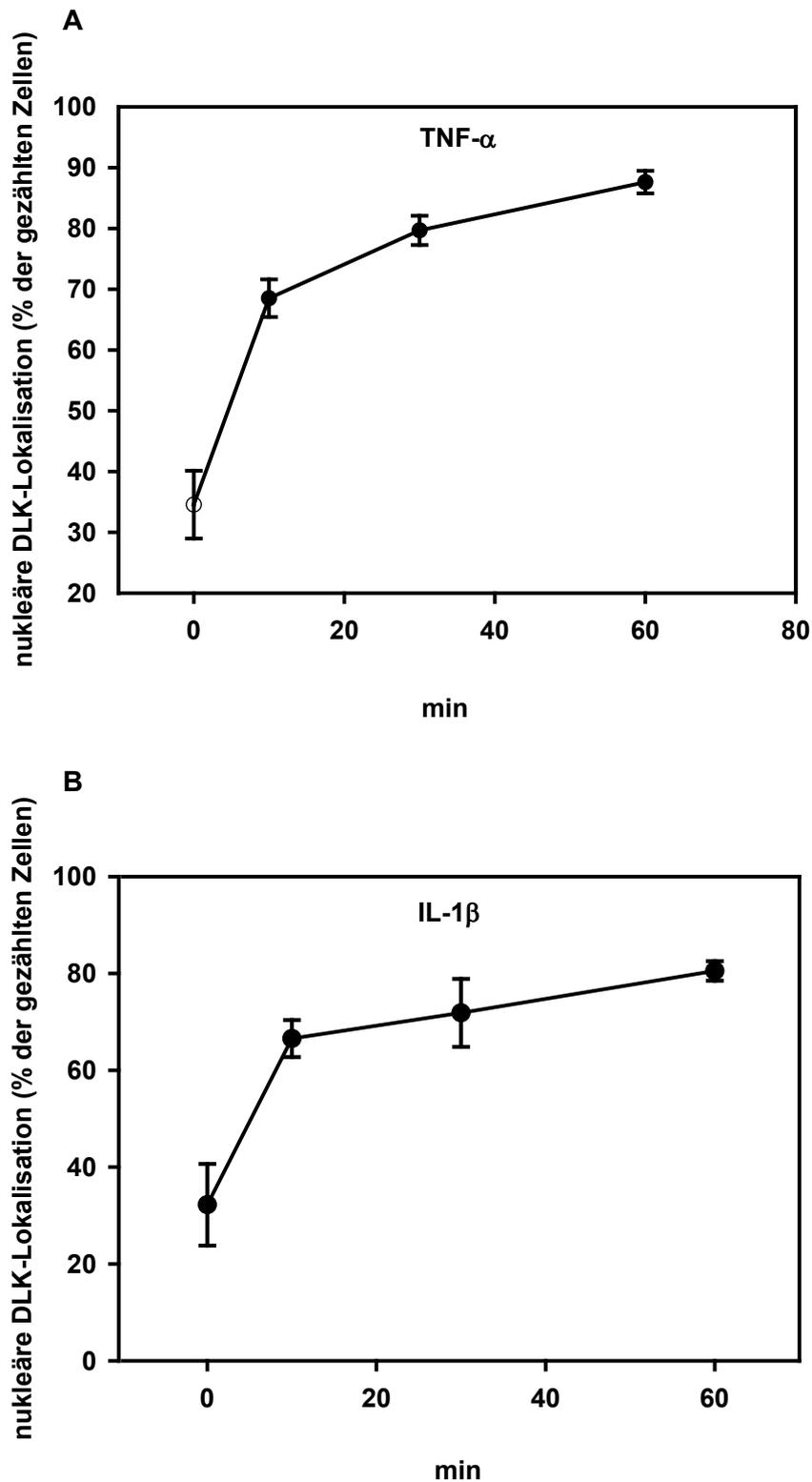


Abb. 3.4: Zeit-Wirkungskurve der DLK-Lokalisation in HIT-Zellen unter Einfluss der Zytokine TNF- α (A) und IL-1 β (B). Quantitative Auswertung der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen. Die Abbildungen zeigen die zeitabhängige Translokation der DLK in den Kern. Auf der Abszisse ist die Behandlungszeit mit dem jeweiligen Zytokin (10 ng/ml) in Minuten (Behandlungszeit 10, 30, 60 min) aufgetragen. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, bei denen die DLK im Kern detektierbar war. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

3.1.2 Einfluss der JNK-Aktivierung auf die Translokation der DLK

Die Aktivierung der DLK durch TNF- α (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht) führt unter Einbeziehung der nachgeschalteten Kinasen MKK7 bzw. MKK 4 zu einer Aktivierung von JNK (Nihalani et al 2001, 2003). Auch das Zytokin IL-1 β konnte als JNK-Aktivator identifiziert werden (Larsen et al. 1998; Welsh 1996). Aktiviertes JNK stabilisiert seinerseits die aktiven Komponenten des JNK-Signalweges, wie z.B. die DLK, und führt somit zu einer Signalamplifikation (feed-forward loop) und zu einer gesteigerten Aktivität dieses Signalwegs (Xu et al. 2005). Die Aktivierung von JNK führt über Phosphorylierung von JIP zu einer Dissoziation der DLK von ihrem Adapter-Protein (Nihalani et al. 2003). Ob sich der durch JNK-Aktivierung induzierten Dissoziation der DLK von ihrem Adapter-Protein JIP eine Translokation der DLK in den Kern anschließt, ist die zentrale Fragestellung dieses Versuches. Der Einfluss der JNK-Aktivierung auf die durch TNF- α und IL-1 β induzierte Translokation der DLK in den Kern sollte durch Einsatz des JNK-Inhibitors SP600125 in einer immunzytochemischen Untersuchung geklärt werden. Hierzu wurden HIT-Zellen mit DLK-Wildtyp transfiziert, in vier Gruppen ausplattiert und für 48 h inkubiert. Zwei Gruppen wurden 90 min vor dem Ernten mit SP600125 (25 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Eine der mit SP600125 behandelten Gruppen sowie eine Gruppe nicht behandelter Zellen wurde 60 min vor dem Ernten mit TNF- α bzw. IL-1 β (jeweils 10 ng/ml) inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente eine Gruppe unbehandelter Zellen. Die Positiv-Kontrolle stellten zwei Gruppen Zellen dar, die entweder mit TNF- α oder IL-1 β behandelt wurden. Aus Abb. 3.5 ist ersichtlich, dass eine Hemmung der JNK-Aktivierung durch den JNK-Inhibitor SP600125 zu einer signifikant verminderten Translokation der DLK in den Nukleus führte. Nach alleiniger Behandlung mit TNF- α stieg der Anteil der Zellen, bei denen die DLK im Kern lokalisiert war, um den Faktor 2,8 (n=6), nach Behandlung mit IL-1 β um den Faktor 2,7 (n=6) im Vergleich zur Kontrollgruppe. SP600125 selbst besaß einen leichten Einfluss auf die Translokation der DLK und erhöhte statistisch signifikant unter basalen Bedingungen den prozentualen Anteil an Zellen mit DLK im Kern um den Faktor 1,3 (n=6) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt auf die Lokalisation der DLK muss bei der Interpretation der Daten für die mit SP600125 behandelten Zellen berücksichtigt werden. Nach Behandlung mit der Kombination von SP600125 und TNF- α bzw. IL-1 β kam es nur zu einer prozentualen Zunahme an Zellen mit DLK im Kern um den Faktor 1,7 (n=6) bzw. um den Faktor 1,8 (n=6). Die gleichzeitige Inkubation mit dem JNK-Inhibitor verminderte somit die Zytokin-induzierte Translokation der DLK.

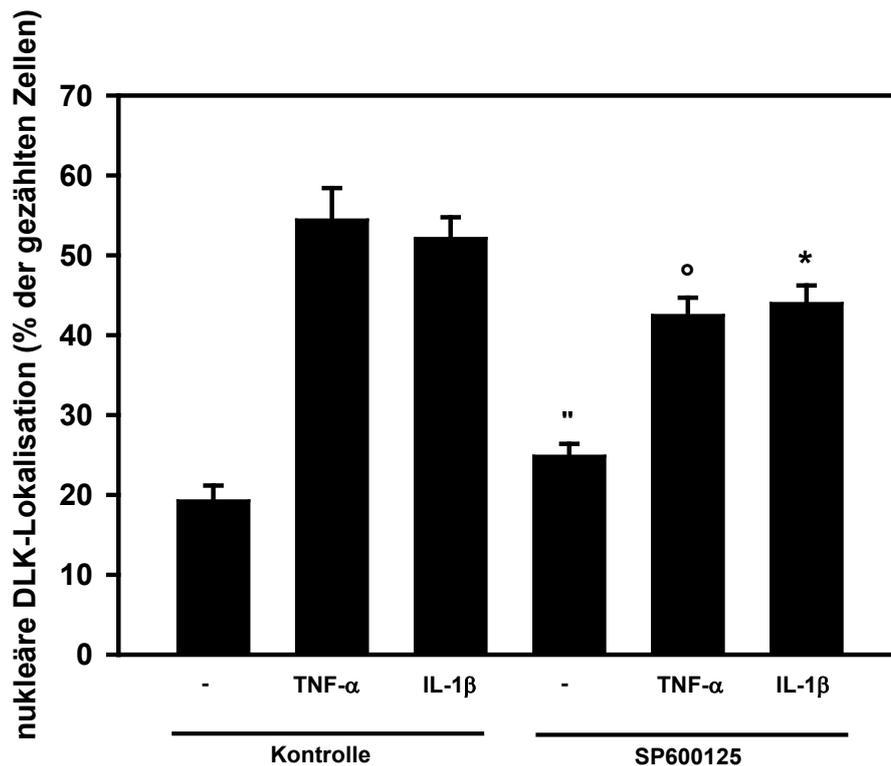


Abb. 3.5: Einfluss der JNK-Aktivität auf die Translokation. Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen (n=6). Die transiente Transfektion erfolgte mit 2 µg Expressionsvektor für DLKwt/Schale. Die Behandlung mit SP600125 (25µmol/l) erfolgte in der entsprechenden Gruppe für 90 min. Die Behandlung mit den Zytokinen TNF-α und IL-1β mit jeweils 10 ng/ml erfolgte, wenn angegeben, für jeweils 60 min. Auf der Abszisse sind die entsprechend behandelten Gruppen dargestellt. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil von Zellen mit DLK im Kern. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. °, * p ≤ 0,05 (t-Test) gegen die entsprechenden Gruppen (Gruppe -, TNF-α, IL-1β) in Abwesenheit von SP600125. Die Gültigkeit dieser Auswertung und die damit verbundene Unabhängigkeit der gewählten Gruppen wurde durch eine Varianzanalyse mittels ANOVA überprüft (p ≤ 0,05).

3.1.3 Ultrastrukturelle Analyse durch Immunogold-Elektronenmikroskopie

Um die Vermutungen der TNF-α induzierten Translokation mit einer zweiten Methode zu verifizieren und einen ultrastrukturellen Aufschluss über die Lokalisation der DLK innerhalb der HIT-Zellen zu bekommen, wurde die Elektronenmikroskopie verwendet. Die Methode diente ebenfalls der Untersuchung von Beta-Zell-typischen morphologischen Charakteristika in den HIT-T15-Zellen. Der Ablauf der Methode wurde in Kap. 2.10 „Immunogold-Elektronenmikroskopie“ beschrieben. Abb. 3.6 zeigt eine HIT-Zelle mit dem für diese Tumorzelllinie typischen großen Kern. Innerhalb des Zytoplasmas zeigen sich eine große Anzahl von Mitochondrien sowie der stark ausgeprägte Golgi-Apparat der HIT-Zellen. Es finden sich außerdem die für insulinproduzierende Zellen typischen Insulingranula mit hellem Hof, die vom rauen Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma sezerniert werden. Die Darstellung der DLK in den HIT-Zellen wurde durch indirekte Immunzytochemie unter Verwendung

3. Ergebnisse

des Anti-Flag Antikörpers und einem sekundären Gold-gekoppelten Antikörper erreicht. Für Untersuchungen der DLK-Translokation wurden die Zellen für 60 min mit TNF- α (10 ng/ml) behandelt. Abb. 3.7 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von HIT-Zellen nach immunzytochemischer Behandlung. In Abb. 3.7 A ist die überexprimierte, FLAG-Epitop markierte DLK in HIT-Zellen zu sehen. Die DLK ist auf dieser Aufnahme größtenteils im Zytoplasma, aber auch teilweise im Kern lokalisiert. Nach der Behandlung mit TNF- α ließen sich vermehrt Goldkugelchen des sekundären Antikörpers im Kern detektieren (Abb. 3.7 B). Durch den Einfluss von TNF- α kam es zu einer Zunahme von DLK im Zellkern. Um herauszufinden, ob die Translokation der DLK von ihrer Kinase-Funktion abhängt, wurde die DLK K185A, eine Kinase-inaktive DLK-Mutante, in die HIT-Zellen transfiziert. Man kann Abb. 3.6 D entnehmen, dass auch die DLK K185A nach Behandlung mit TNF- α vermehrt im Kern detektierbar war. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die TNF- α induzierte Translokation der DLK unabhängig von der Fähigkeit der ATP-Bindung war.

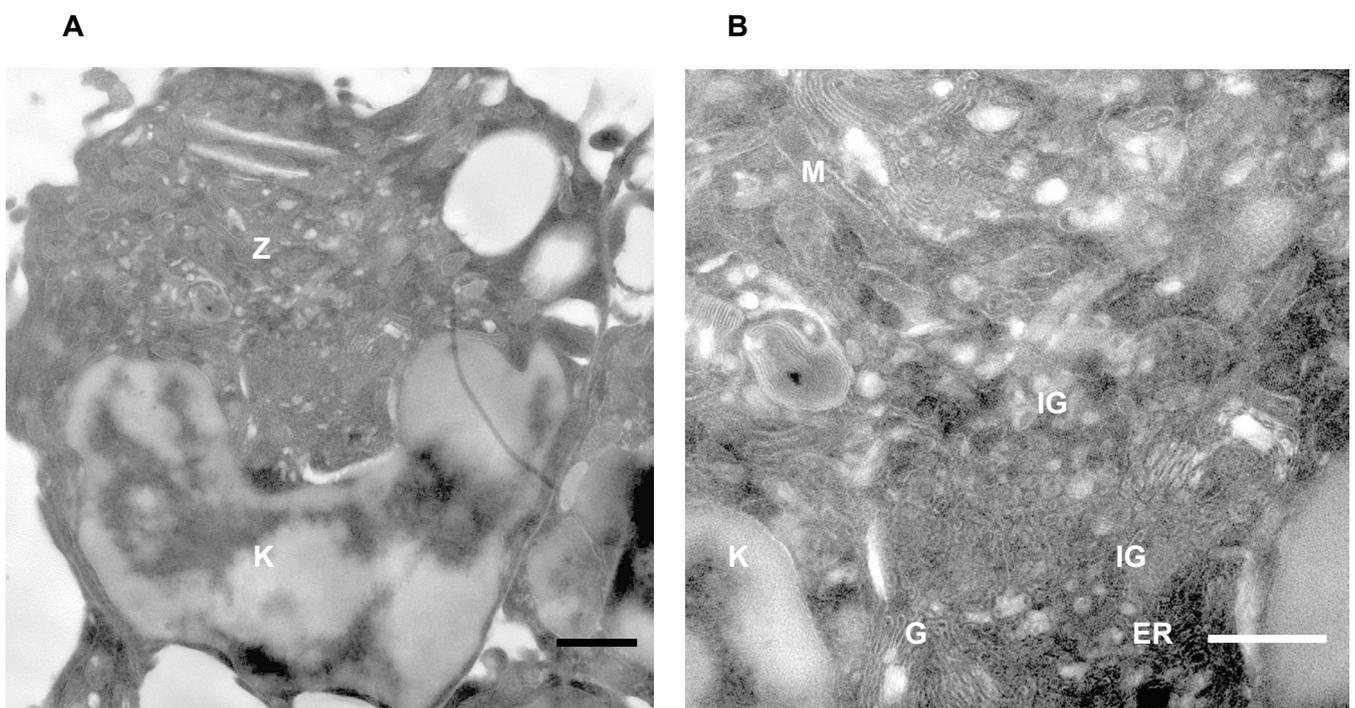


Abb. 3.6: A Elektronenmikroskopisches Bild einer HIT-Zelle. B Vergrößerter Bildausschnitt. Gezeigt sind in LR-Gold eingebettete HIT-Zellen. K steht für den Kern, Z für Zytoplasma, IG für Insulingranula, G für den Golgi-Apparat, ER für das Endoplasmatische Retikulum, M für Mitochondrium. Der schwarze Balken in Bild A entspricht 1 μ m. Der weiße Balken in B entspricht 400 nm

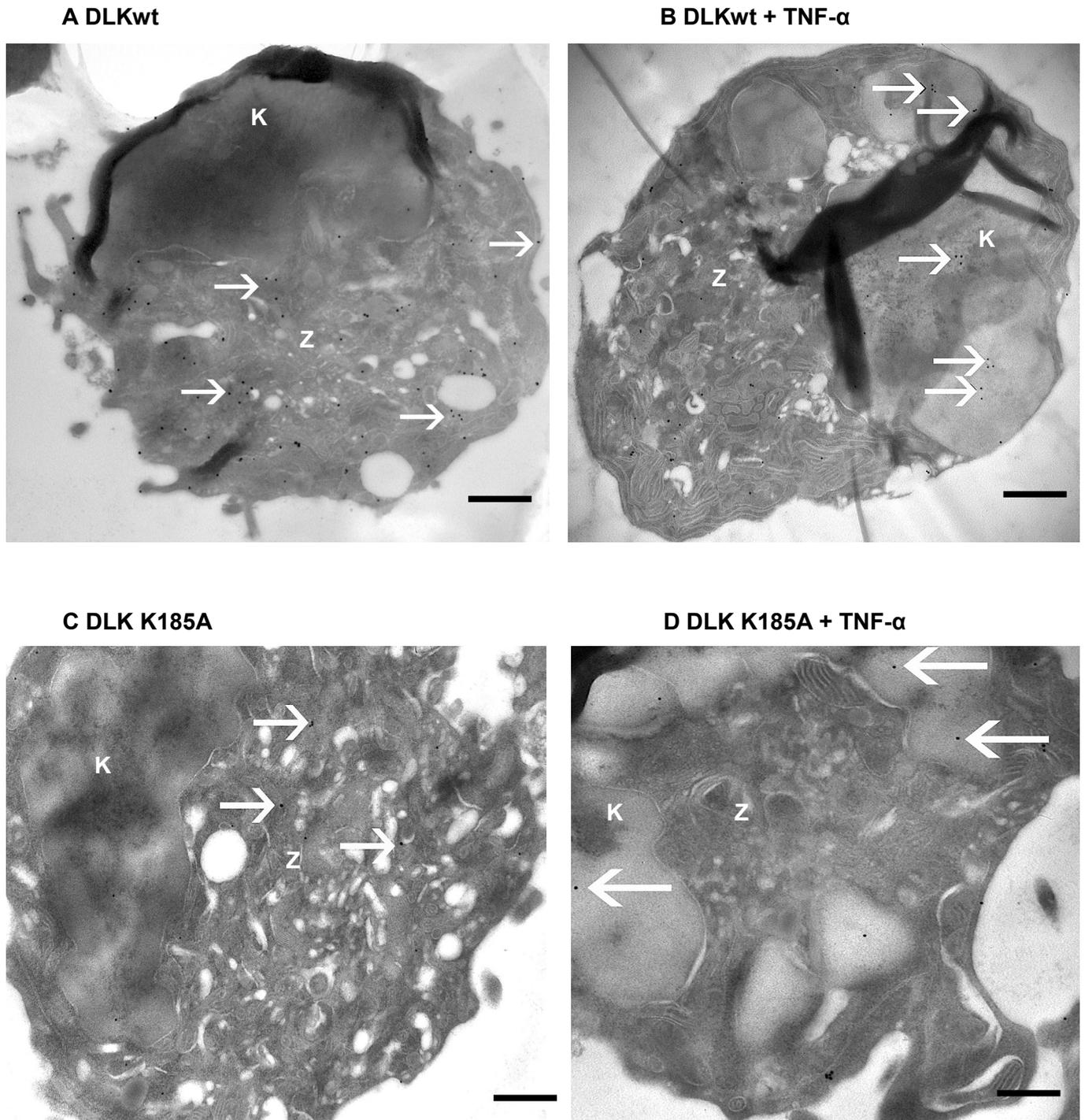
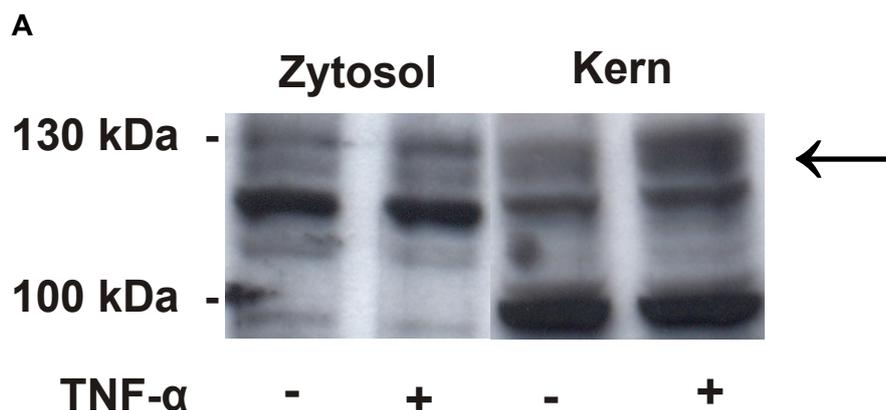


Abb. 3.7: Ultrastrukturelle Darstellung der Lokalisation von DLK und der Mutante DLK K185A in HIT-Zellen. HIT-Zellen ohne (A/C) bzw. mit TNF- α -Behandlung (10 ng/ml für 60 min) (B/D). A und B zeigen mit DLKwt transient transfizierte HIT-Zellen nach Inkubation mit dem Anti-FLAG-M2-Antikörper. Die Zellen in E und F wurden mit DLK K185A transient transfiziert und mit dem Anti-FLAG-M2-Antikörper inkubiert. Die weißen Pfeile markieren die schwarzen Goldkügelchen des sekundären Antikörpers. Gut sichtbar, durch die Kernmembran getrennt, sieht man den Kern (K) und das Zytoplasma (Z). Der schwarze Balken entspricht 1 μ m.

3.1.4 Identifizierung der DLK-Lokalisation in HIT-T15-Zellen mittels Zellfraktionierung

Um die subzelluläre Verteilung der endogenen DLK in den HIT-Zellen zu untersuchen, wurden HIT-Zellen für 48 h inkubiert, anschließend in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt (siehe Kap. 2.7) und mittels Western Blot, unter Verwendung des DLK-Antikörpers, ausgewertet. Um auch mittels Zellfraktionierung den Einfluss von TNF- α auf die Verteilung der DLK innerhalb der HIT-Zellen zu untersuchen, wurde eine Gruppe Zellen 60 min vor dem Ernten mit TNF- α (10 ng/ml) inkubiert. Abb. 3.8 zeigt einen Western Blot der Zellfraktionierung (Zellfraktionierung 1). Die Immunreaktion lieferte sowohl in der Zytosol- als auch in der Kernfraktion eine DLK-spezifische Bande bei 130 kDa. Innerhalb der Kernfraktion kam es durch Behandlung mit TNF- α zu einer Zunahme der DLK-Bande bei 130 kDa. Zusätzlich ließ sich eine Bande innerhalb der Kernfraktion bei ca. 100 kDa nachweisen. Abb. 3.9. zeigt die densitometrisch ausgewerteten Daten von drei unabhängig voneinander in Doppelbestimmung durchgeführten Western-Blot-Analysen (n=6) (Zellfraktionierung 1). Ausgewertet wurde die DLK-repräsentative Bande bei 130 kDa. Aus den Daten ist zu entnehmen, dass es, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle, durch die Behandlung mit TNF- α zu einem signifikanten Anstieg von DLK im Kern auf $152,4 \% \pm 19,77$ (n=6), kam. Dieser Anstieg des DLK-Gehalts im Zellkern steht im Einklang mit den bisher erhobenen Daten (siehe oben). In der zytosolischen Fraktion zeigte sich eine nicht signifikante Zunahme von DLK unter Einfluss von TNF- α .



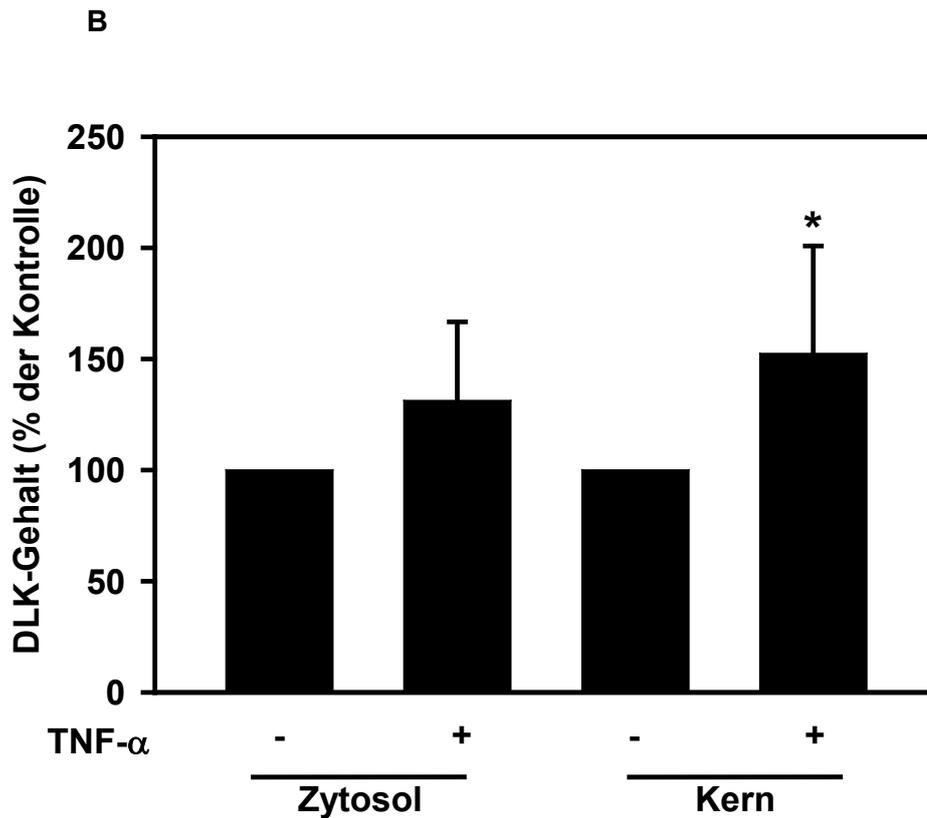


Abb. 3.8: Einfluss von TNF- α auf die Lokalisation der DLK in HIT-Zellen. (A) Gleiche Mengen an Protein (200 μ g) der Zytosol- und Kernfraktion von fraktionierten HIT-T15 Zellen wurden auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen und durch Immunoblotten mit dem DLK-Antikörper analysiert. TNF- α Behandlung erfolgte mit 10 ng/ml für 60 min. Die DLK migriert bei 130 kDa. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. Der schwarze Pfeil repräsentiert die DLK-Bande bei 130 kDa. (B) Quantitative Auswertung des Western Blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). In den jeweiligen Fraktionen ist die optische Dichte der DLK-repräsentativen Bande relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. * $p \leq 0,05$ versus Gruppe Kernfraktion ohne TNF- α .

Das darüber hinaus verwendete Zellfraktionierungsprotokoll (Zellfraktionierung 2) lieferte den in Abb. 3.9 dargestellten exemplarischen Western Blot. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass es innerhalb der Kernfraktion zu einer Zunahme der DLK-Bande nach Behandlung mit TNF- α kommt. Auch dieser Blot liefert eine deutliche Bande innerhalb der Kernfraktion bei den oben erwähnten 100 kDa.

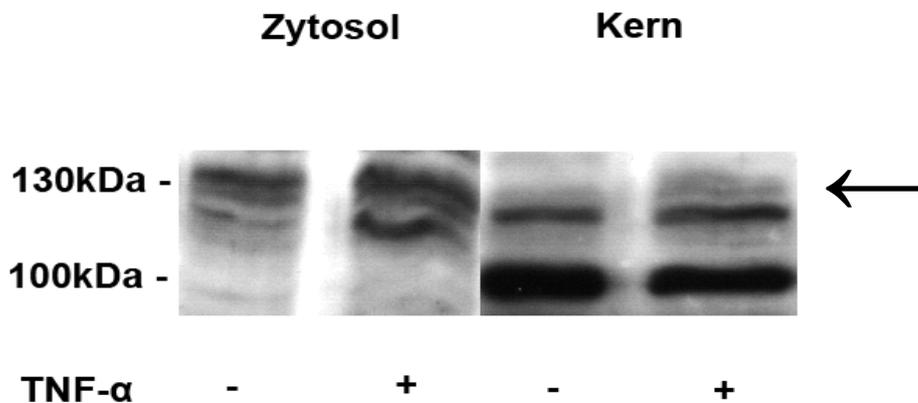


Abb. 3.9: Zellfraktionierung nach Methode 2. Es wurden 200 μ g Protein der Zytosol- bzw. 100 μ g Protein der Kernfraktion für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die fraktionierten HIT-T15 Zellen wurden auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen und durch Immunoblotten mit dem DLK-Antikörper analysiert. Die DLK migriert bei 130 kDa. Der schwarze Pfeil zeigt die spezifische DLK-Bande. Dargestellt ist ein exemplarisches Beispiel.

3.2 Charakterisierung einer Kernerkennungssequenz

In den vorangegangenen Experimenten konnte die DLK nach Behandlung mit TNF- α bzw. IL-1 β im Zellkern detektiert werden. Daraufhin wurde die Primärstruktur auf das Vorhandensein einer Kernerkennungssequenz analysiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Sequenzcharakterisierung dargestellt.

3.2.1 Analyse der Primärstruktur der DLK

Da die DLK mit 130 kDa zu groß für die passive Diffusion ist, wurde die Primärstruktur der Maus-DLK auf eine Kernerkennungssequenz hin untersucht. Für diese Analyse kam eine *in-silico-Analyse* unter Verwendung der Suchmaschine für Proteinprofile MyHits (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index> (Hulo et al. 2008)), basierend auf „The PROSITE database“ (Falquet et al. 2002) zum Einsatz. Sie lieferte eine putative zweiteilige Kernerkennungssequenz zwischen den Aminosäuren 185 und 203, welche im Ratten- (MUK), Drosophila- (Wallenda) und humanen (ZPK) Äquivalent der DLK konserviert ist. Die folgende Zusammenstellung gibt die Sequenzen von Proteinen im Vergleich wieder, die eine zweiteilige Kernerkennungssequenz besitzen.

DLK	¹⁸⁵ <u>KKVRDLKETDIKHLRKLKH</u> ₂₀₃
ZPK	<u>KKVRDLKETDIKHLRKLKH</u>
MUK	<u>KKVRDLKETDIKHLRKLKH</u>
Wallenda	<u>KKVKE</u> LKETDIKHLRKLKD
Nucleoplasmin	<u>KRPA</u> ATKKAGQAK <u>KKK</u>
Östrogenrezeptor	<u>RKCYE</u> VGMMKGGIR <u>KDR</u>

Abb. 3.10: Sequenzvergleich der zweiteiligen Kernerkenntnissequenz zwischen den DLK-Homologen DLK, ZPK, MUK, Wallenda (siehe Kap. 1.7), dem Nucleoplasmin und dem Östrogenrezeptor. Die Nummerierung entspricht der Sequenz der murinen DLK. Die an der zweiteiligen Kernerkenntnissequenz beteiligten Aminosäuren sind unterstrichen dargestellt. Das Zwischenstück besteht aus 7-12 Aminosäuren.

3.2.2 Herstellung von DLK-Mutanten mit veränderten Kernerkenntnissequenzen

Um die „in silico“ identifizierte Kernerkenntnissequenz genauer zu untersuchen, wurden die Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2 und DLK NLS Doppel hergestellt, bei denen die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin in Alanine mutiert wurden (siehe Kap 2.4.1 Zielgerichtete Mutagenese). Zur Herstellung der DLK NLS 1 wurden die AS 186 und 188 und zur Herstellung der DLK NLS 2 die AS 196, 199, 200 in Alanine mutiert. Die Funktion der Kernerkenntnissequenz sollte durch diese Veränderungen der Basensequenz zerstört werden. Die DLK NLS Doppel besitzt die Mutationen der DLK NLS 1 und NLS 2. Tab. 3.1 stellt die Aminosäuresequenz der jeweilig hergestellten DLK-Konstrukte innerhalb der putativen Kernerkenntnissequenz dar.

Tab. 3.1 : Ausschnitt der Aminosäuresequenz der DLK-Mutanten. Die in Alanin mutierten Aminosäuren sind dick gedruckt.

Konstrukt	Aminosäuresequenz (185-203)
DLKwt	KKVRDLKETDIKHLRKLKH
DLK NLS 1	KAVADLKETDIKHLRKLKH
DLK NLS 2	KKVRDLKETDIAHLAALKH
DLK NLS Doppel	KAVADLKETDIAHLAALKH

3.2.3 Einfluss der Mutation der Kernerkennungssequenz auf die Lokalisation von DLK

Um zu überprüfen, ob die tatsächliche funktionelle Kernerkennungssequenz durch die Mutationen verloren gegangen ist, wurden die Mutanten transient in HIT-Zellen transfiziert. Mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Detektion des FLAG-Epitopes wurde die Verteilung der Mutanten innerhalb der Zelle analysiert. Der Abb. 3.11 können immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der mit den jeweiligen DLK-Konstrukten transfizierten Zellen entnommen werden. Es ist jeweils eine Anti-FLAG-Färbung, ein Durchlichtbild, eine Kernfärbung mit DAPI sowie ein Überlagerungsbild zu sehen. Mit dem DLK-Wildtyp transfizierte Zellen zeigten nach 60-minütiger Behandlung mit TNF- α bzw. IL-1 β (jeweils 10 ng/ml) eine vermehrte DLK-Lokalisation im Kern, während die Zellen, die mit Expressionsvektoren für DLK NLS 1 und DLK NLS 2 transfiziert wurden, keine verstärkte Kernlokalisierung nach Behandlung mit den beiden Zytokinen zeigten. Die DLK NLS Doppel Mutante konnte in HIT-Zellen nicht exprimiert werden (siehe Kap. 3.3.1). Der quantitativen Auswertung der drei unabhängigen, in Doppelbestimmung durchgeführten Experimente kann entnommen werden, dass es unter Behandlung mit TNF- α bzw. IL-1 β zu einer Akkumulation des DLK-Wildtyps im Kern der HIT-Zellen kam (Abb. 3.12). Während unter Einfluss von TNF- α der prozentuale Anteil von Zellen mit DLK im Kern von 23,2 % \pm 1,6 auf 61,9 % \pm 4,7 (Faktor 2,7) anstieg, stieg er unter Einfluss von IL-1 β auf 61,27 % \pm 3,34 (Faktor 2,6). Demgegenüber führte die Mutation des ersten (DLK NLS 1) und des zweiten Teils (DLK NLS 2) der Kernerkennungssequenz zu einer deutlichen Verminderung der Zytokin-induzierten Translokation in den Kern. Die Ergebnisse zeigen, dass Mutationen in einem Teil der Kernerkennungssequenz suffizient waren, um die Translokation der DLK zu verhindern. Aus den Daten folgt somit, dass beide Teile der Kernerkennungssequenz notwendig sind, um einen Kerntransport der DLK zu ermöglichen.

3. Ergebnisse

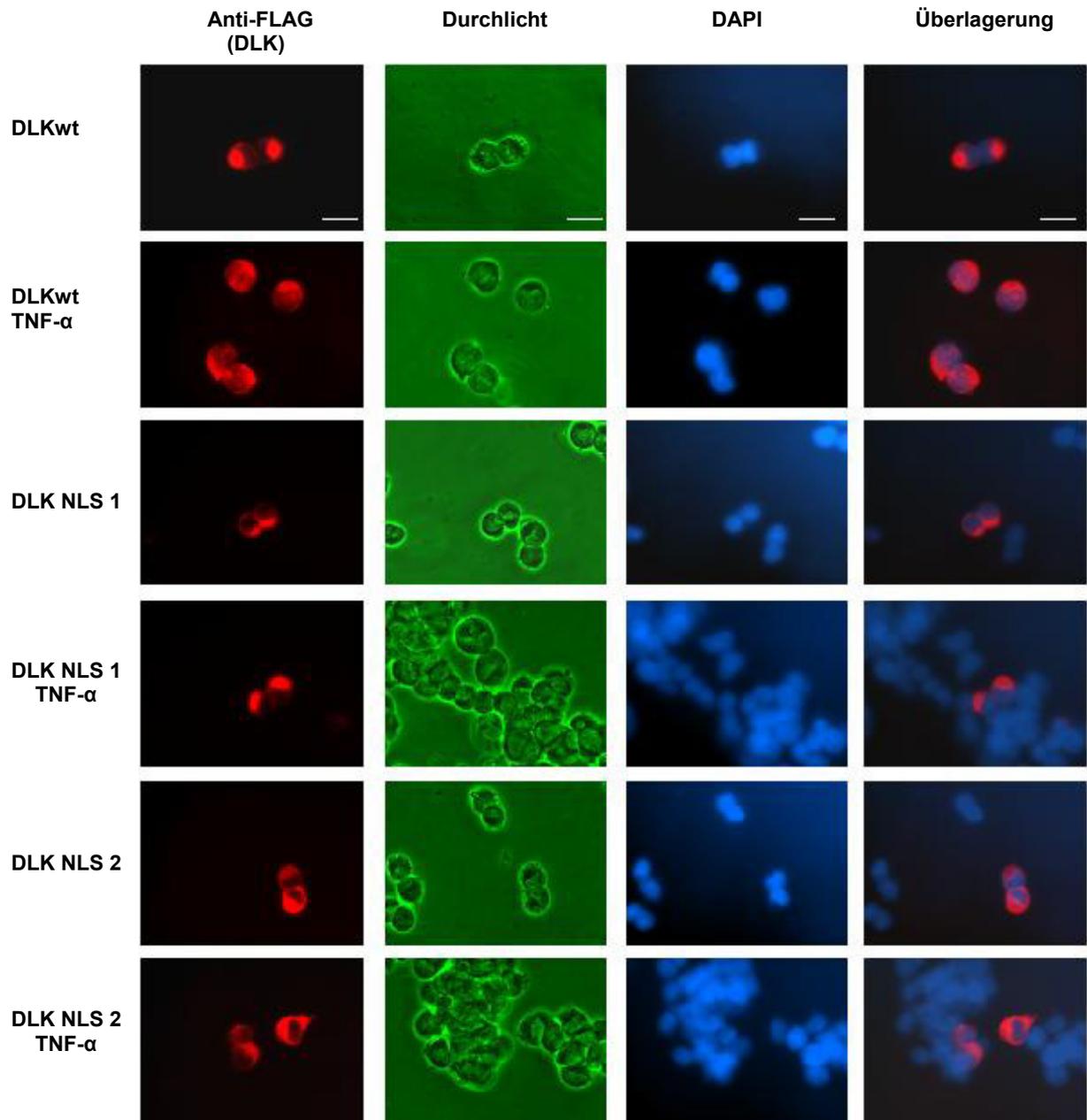


Abb. 3.11: Immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der transient transfizierten HIT-Zellen. Nach Transfektion der Expressionsvektoren für DLKwt, DLK NLS 1 und DLK NLS 2 mit METAFECTENE® (2 μ g DNA/Schale) wurden die Zellen 48 h inkubiert. Gezeigt ist jeweils eine Anti-FLAG-Färbung, ein Durchlichtbild, eine Kernfärbung mittels DAPI sowie ein Überlagerungsbild. Wenn angegeben, erfolgte eine Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α 60 min vor dem Ernten. Der weiße Balken entspricht 20 μ m in allen Einzelbildern.

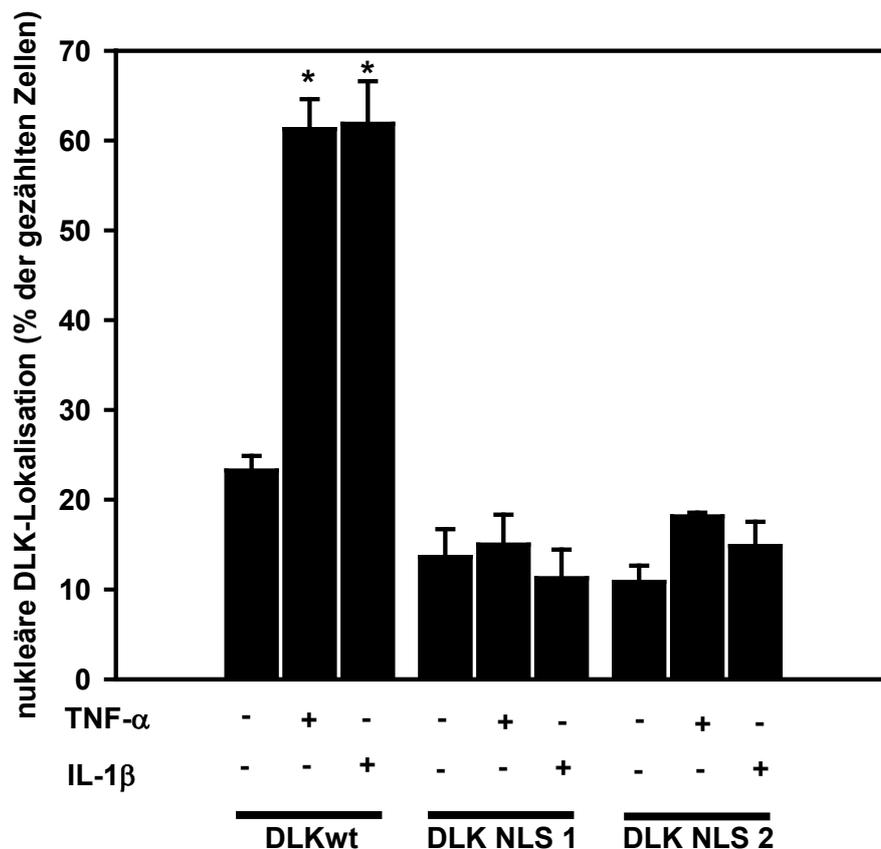


Abb. 3.12: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil von Zellen mit DLK im Kern. Es wurden jeweils 2 µg DNA/Schale transient transfiziert. Wenn angegeben, erfolgte eine Behandlung mit TNF-α bzw. IL-1β in einer Konzentration von 10 ng/ml. Dargestellt sind Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). * p ≤ 0,05 (t-Test) versus Gruppe DLKwt ohne Behandlung.

3.3 Effekt der DLK-NLS-Mutanten auf die CREB-abhängige Gentranskription

Vorherige Studien zeigen die esentielle Rolle von CREB für die Aufrechterhaltung der Beta-Zellfunktion und der Beta-Zellmasse (Oetjen et al. 2003a, 2003b, 2006). Über die DLK ist bekannt, dass sie Apoptose in Beta-Zellen induziert und den Beta-Zell-protectiven Transkriptionsfaktor CREB sowie auch seinen Koaktivator CBP hemmt (Plaumann et al. 2008; Oetjen et al. 2006). Im Folgenden wurde die Auswirkung der Kernerkenntnissequenz, bezogen auf die Beta-Zellfunktion und Beta-Zell-Apoptose, untersucht.

3.3.1 Expression der DLK-Mutanten in HIT-T15-Zellen

Die Expression der einzelnen DLK-Mutanten in HIT-Zellen sollte mit Hilfe eines Western Blots untersucht werden. GAPDH diente hierbei der Kontrolle der gleichmäßigen Proteinauftragung. Der Abb. 3.13 kann entnommen werden, dass die hergestellten Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2, ebenso wie der DLKwt und die DLK K185A in den HIT-Zellen exprimiert wurden. Hingegen konnte die Mutante DLK NLS Doppel nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Dies entsprach den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmikroskopie, bei denen die DLK NLS Doppel-Mutante ebenfalls nicht detektiert werden konnte. Die Ursache für die Tatsache, dass die DLK NLS Doppel-Mutante in den HIT-Zellen nicht exprimiert wurde, konnte nicht gefunden werden.

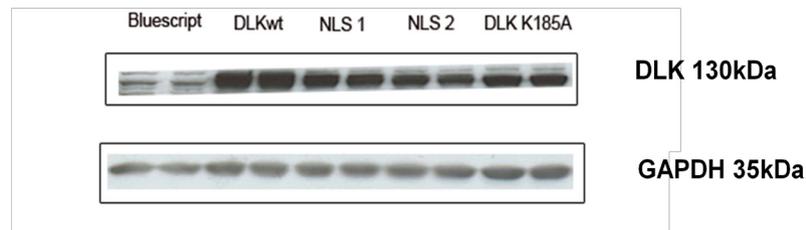


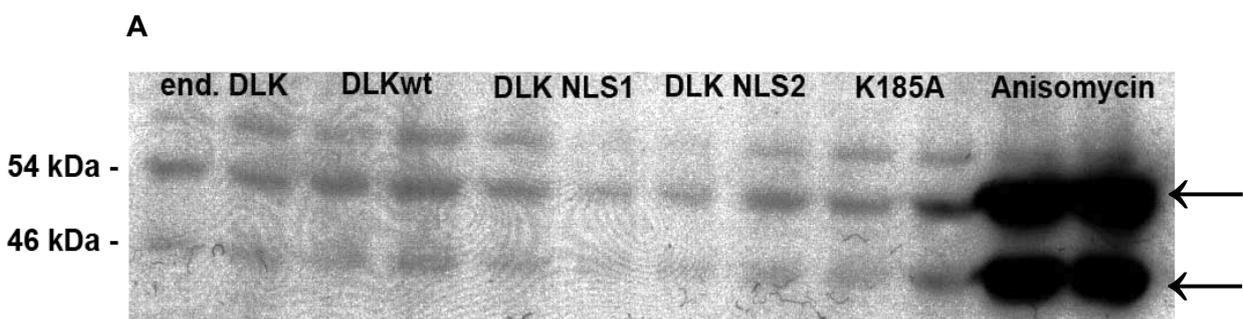
Abb. 3.13: Expression der DLK-Mutanten in HIT-Zellen. Western Blot von HIT-Zelllysaten nach Inkubation mit Anti-DLK- und Anti-GAPDH-Antikörper. Die Expressionsvektoren für DLKwt, DLK 1, NLS 2 und DLK K185A wurden transient transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und gleiche Proteinmengen (200 µg/Tasche) wurden aufgetragen. Für die Gelelektrophorese wurde ein 8 %iges SDS-Gel verwendet.

3.3.2 Phosphorylierung von JNK als Maß für die katalytische Aktivität der DLK-Mutanten

Wie in der Einleitung dargestellt, ist JNK eine untergeordnete Kinase der DLK. Über die Aktivierung von MKK7 bzw. MKK4 führt die DLK zu einer Phosphorylierung von JNK. Die DLK benötigt für diesen Aktivierungsschritt eine funktionierende Kinasedomäne, welche für die Phosphorylierung notwendig ist. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit verwendeten DLK-Mutanten enzymatisch aktiv sind, wurde durch Überexpression der einzelnen Mutanten die Phosphorylierung von JNK in HIT-Zellen untersucht. Zur Klärung dieser Frage kam eine Western Blot-Analyse zum Einsatz. Hierzu wurden HIT-Zellen mit den entsprechenden DLK-Konstrukten transfiziert und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und für den Einsatz im Western Blot aufgearbeitet (siehe Kap. 2.6.1–2.6.5). Um zu unterscheiden, ob DLKwt und ihre Mutanten die untergeordnete Kinase JNK aktivieren, wurde der phosphospezifische JNK-Antikörper verwendet. Die Phosphorylierung von JNK galt dabei als

3. Ergebnisse

Maß für ihre Aktivität. Zum immunologischen Nachweis von JNK kam desweiteren ein JNK-Antikörper zum Einsatz (siehe Kap. 2.6.5). Abb. 3.14 A zeigt einen Western Blot nach Inkubation mit dem phosphospezifischen Antikörper. Für JNK ist bekannt, dass es bei zwei unterschiedlichen Größen (54 kDa und 46 kDa) im SDS-Gel detektiert werden kann. Die unterschiedlichen Größen dieser JNK-Formen kommen durch alternatives Splicen während der Prozessierung der JNK-mRNA innerhalb des Zellkerns zustande. Als Positiv-Kontrolle für den Versuch dienten 5 µg/ml Anisomycin. Anisomycin ist ein Inhibitor der Proteinsynthese und konnte als sehr starker Induktor für eine JNK-Aktivierung identifiziert werden. Die Inkubation mit Anisomycin erfolgte 30 min vor dem Ernten der Zellen. Der exemplarische Western Blot in Abb. 3.13 A zeigt, dass sowohl Überexpression von DLKwt als auch der DLK-Mutanten NLS 1 und NLS 2 zu einer JNK-Phosphorylierung führten. Diese Phosphorylierung schien jedoch bei Überexpression der DLK-Mutanten NLS 1 und NLS 2 etwas schwächer zu sein. Abb. 3.14 B zeigt einen Western Blot nach Inkubation mit dem JNK-Antikörper. Es zeigte sich eine relativ gleichmäßige JNK-Menge innerhalb der verschiedenen Gruppen. Auffällig war, dass die 54 kDa-Bande aus einer feinen Doppelbande bestand, die aus dem unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad von JNK resultieren könnte. Der obere Teil dieser Bande entspricht dem Anteil an phosphoryliertem JNK. Betrachtet man diesen Aspekt genauer, so fällt auf, dass Überexpression des DLK-Wildtyps zu einer stärkeren Phosphorylierung von JNK, bezogen auf die anderen Gruppen, führte. Weiter kann dem Blot entnommen werden, dass bei Überexpression von DLK NLS 2 nur eine schwache obere Teilbande zu sehen war und somit der Anteil an phosphoryliertem JNK im Vergleich zur Gruppe mit DLKwt-Überexpression geringer war. Die quantitative Auswertung der optischen Dichte von P-JNK in den einzelnen Gruppen zeigte, dass eine Überexpression der DLK-NLS-Mutanten zu einer vergleichbar ausgeprägten JNK-Phosphorylierung führte wie eine Überexpression des DLK-Wildtyps. Die Überexpression der DLK-NLS-Mutanten führte jedoch zu einer signifikant stärkeren Phosphorylierung von JNK als die Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A (siehe Abb 3.13 C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die DLK-Mutanten NLS 1 und NLS 2 katalytisch aktive Kinase-Domänen besitzen.



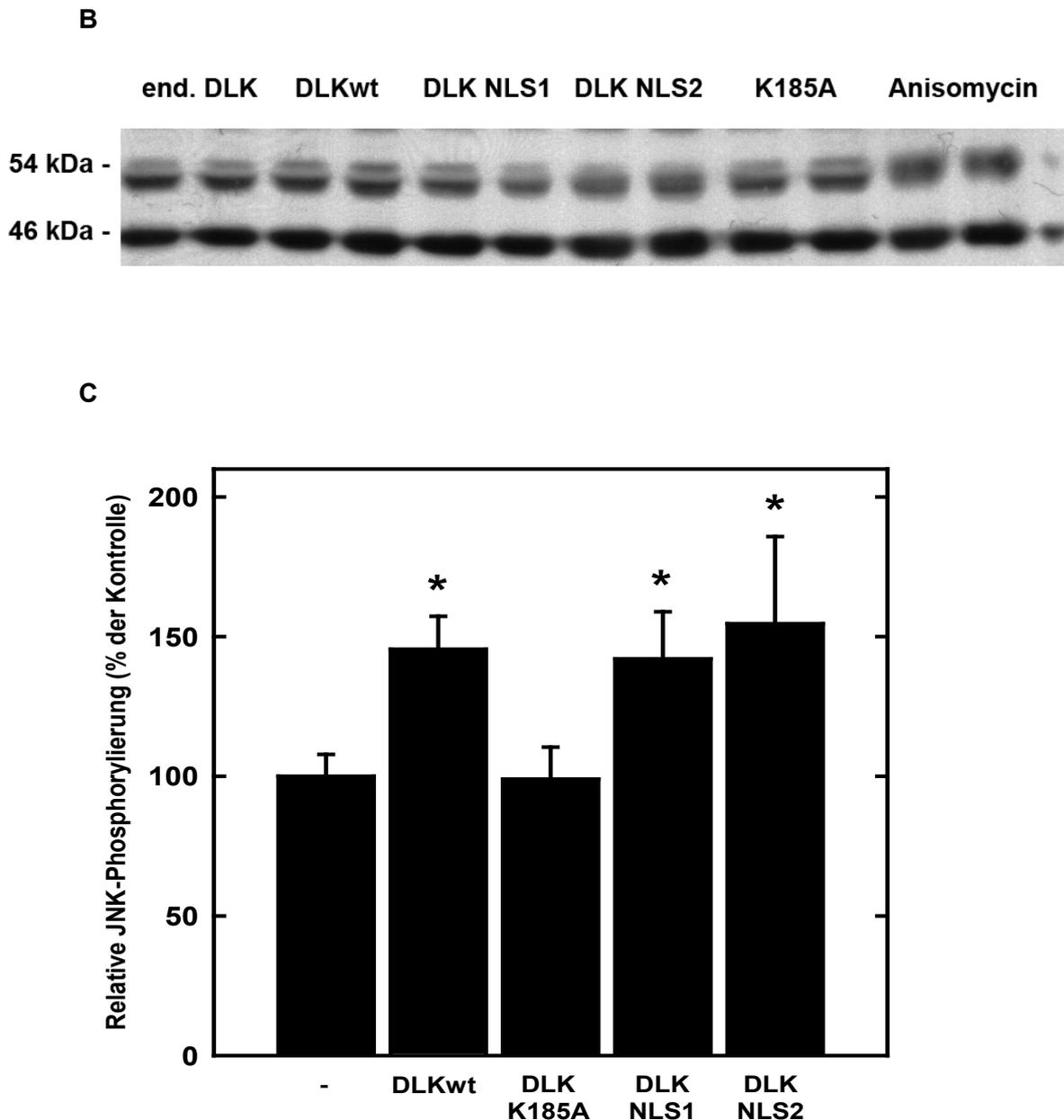
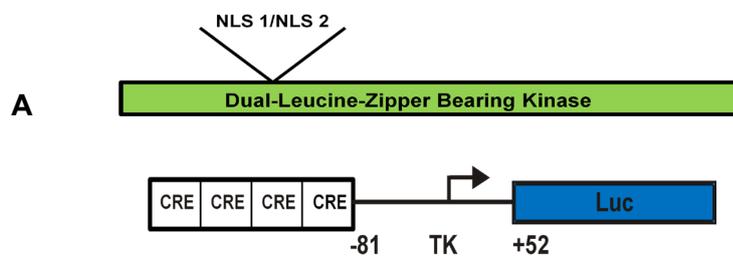


Abb. 3.14: Auswirkung der einzelnen DLK-Mutanten auf den Phosphorylierungsgrad von JNK. HIT-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DLKwt, DLK NLS 1, DLK NLS 2 und DLK K185A transient transfiziert und 48 h inkubiert. Pro Schale wurden jeweils 2 µg DNA/Schale transfiziert. Es ist ein Western Blot nach Inkubation mit dem P-JNK Antikörper (A) bzw. dem JNK-Antikörper (B) gezeigt. Die schwarzen Pfeile in (A) zeigen das detektierte P-JNK, welches typischerweise zwei Banden aufweist (46 kDa und 54 kDa). Die Behandlung mit Anisomycin (5 µg/ml) für 30 min stellt die Positivkontrolle für die JNK-Aktivierung dar. (C) Quantitative Auswertung des Western Blots. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). Das Diagramm zeigt, bezogen auf die Kontrolle, die relative optische Dichte von P-JNK in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.3.3 Auswirkung der DLK-Mutanten auf die CRE-abhängige Gentranskription

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass DLK die CRE/CREB-abhängige Gentranskription inhibiert (Reddy et al. 1994; Oetjen et al. 2006). Um den Effekt der DLK-NLS-Mutanten auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE (cAMP response element)-abhängige Gentranskription zu untersuchen, wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay verwendet. Zu diesem Zweck wurde ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von vier Kopien CRE des Somatostatin Promotors in die HIT-Zellen transient transfiziert. Das CRE stellt die Bindungsstelle für den endogenen Transkriptionsfaktor CREB dar. Kotransfiziert wurden pBluescript zur Kontrolle sowie Expressionsvektoren für DLKwt bzw. deren Mutanten (vgl. Abb. 3.15 A). Die Inkubation der Zellen mit 40 mM Kaliumchlorid führte zur Depolarisation der Zellmembran, was einen konsekutiven Calciumeinstrom durch spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle in die Zellen zur Folge hatte. Für diesen Versuch dienten der DLK-Wildtyp als Positiv- sowie die DLK K185A als Negativ-Kontrolle für eine Hemmung der durch Membran-depolarisation stimulierten Gentranskription. Abb. 3.15 B zeigt, dass eine Membrandepolarisation eine Steigerung der CRE-abhängigen Gentranskription um den Faktor 3 zur Folge hatte. Eine Überexpression des DLK-Wildtyps hemmte die stimulierte Gentranskription. Die Steigerung der Gentranskription durch Membrandepolarisation lag durch Überexpression des DLK-Wildtyps bei nur 1,9. Die Kinase-inaktive DLK K185A sowie die DLK NLS 1 und DLK NLS 2 führten zu keiner Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription. Die Steigerung der Gentranskription lag bei Überexpression der DLK K185A bei 2,2, bei der DLK NLS 1 bei 2,7 und bei der DLK NLS 2 bei 2,8. Tab 3.2 zeigt die Auswirkung der Expressionsvektoren auf die basale, GFP korrigierte Luciferaseaktivität. Dadurch sollte der Einfluss der transfizierten Expressionsvektoren auf die basale Promotoraktivität erfasst werden. Die DLK und ihre Mutanten führten in ähnlicher Weise zu einer leichten Steigerung der basalen CRE-abhängigen Gentranskription im Vergleich zur Kontrolle.



3. Ergebnisse

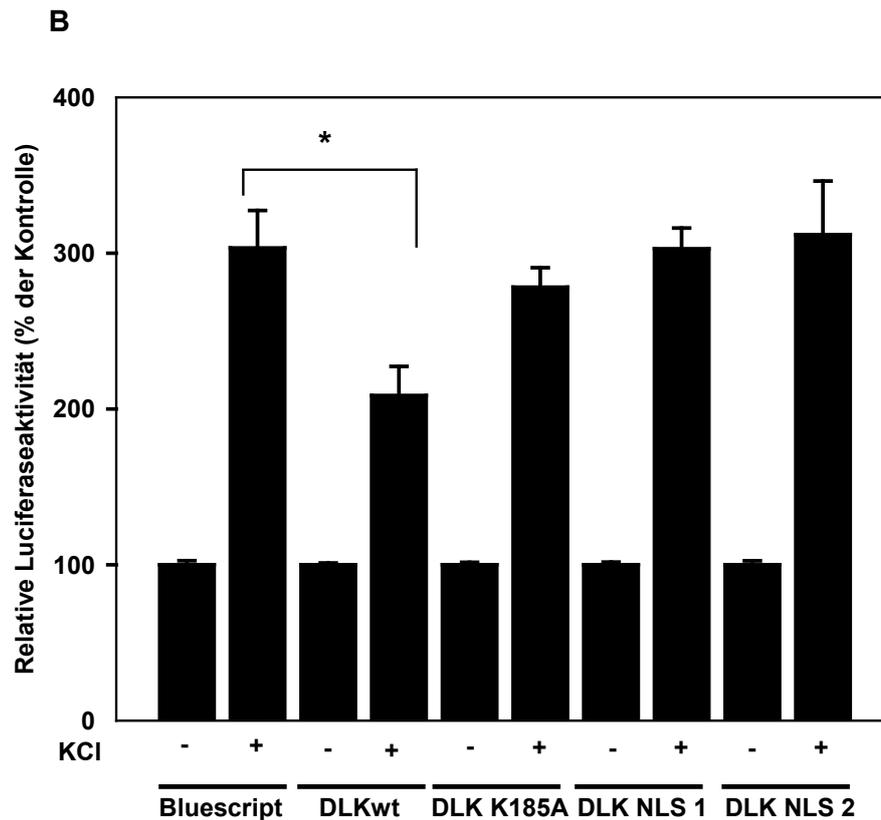


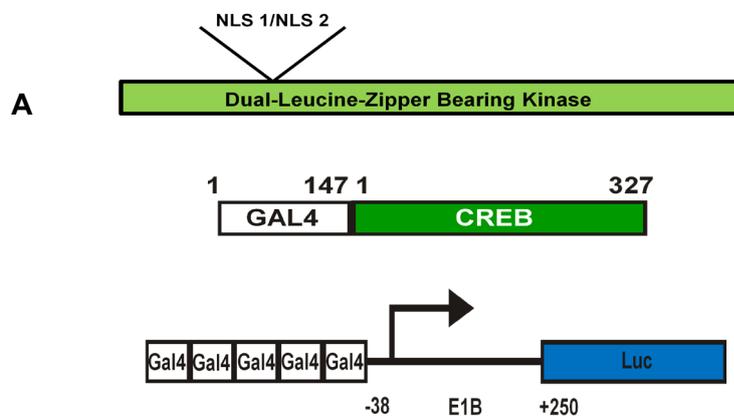
Abb. 3.15: Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die durch Membrandepolarisation stimulierte Gentranskription. **A** Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von vier Kopien CRE, Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). **B** Die Stimulation erfolgte, wenn angegeben, mit 40 mM KCl 6 h vor dem Ernten der Zellen. Die Luciferaseaktivität ist als relativer Wert, bezogen auf den Mittelwert der unstimulierten Kontrolle der jeweiligen Gruppe, dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). * p ≤ 0,05 (t-Test).

Tab. 3.2: Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die basale CRE-abhängige Gentranskription. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von vier Kopien CRE, Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). Dargestellt ist die prozentuale, GFP korrigierte Luciferaseaktivität (Prozent der basalen Luciferaseaktivität im Vergleich zur Gruppe Bluescript). Basalaktivität = Luciferaseaktivität/GFP. n=6.

Expressionsvektor	Basalaktivität	Standardabweichung SEM
Bluescript (Kontrolle)	100,0	2,5
DLKwt	110,9	3,6
DLK K185A	128,6	6,1
DLK NLS 1	111,8	6,1
DLK NLS 2	111,7	8,4

3.3.4 Auswirkung der DLK-Mutanten auf die CREB-abhängige Gentranskription

Um spezifischer eine Aussage über die Auswirkung der Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CREB machen zu können, wurde das GAL-4-System verwendet, bei dem ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf Kopien einer GAL-4-Bindungsdomäne, die 5' zu dem viralen E1B Promotor gelegen ist, sowie ein Expressionsvektor für ein GAL4-CREB-Fusionsprotein in die Zellen transfiziert. Außerdem wurden Expressionsvektoren für DLKwt bzw. deren Mutanten transient transfiziert. Das GAL-4-System diente zur hintergrundfreien Bindung von CREB an das Luciferase-Reportergen (vgl. Abb. 3.16 A). Sechs Stunden vor dem Ernten wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF- α behandelt. Abb. 3.16 B zeigt, dass eine Membrandepolarisation zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität von CREB um den Faktor 5 führte. Überexpression des DLK-Wildtypes führte zu einer Hemmung der stimulierten Gentranskription. Überexpression der DLK-Mutanten NLS 1 und NLS 2 sowie der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A führten zu einer verminderten Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB. Die DLK und ihre Mutanten führten unter basalen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle mit Bluescript in ähnlicher Weise zu einer leichten Steigerung der transkriptionellen Aktivität von CREB (siehe Tab. 3.3).



3. Ergebnisse

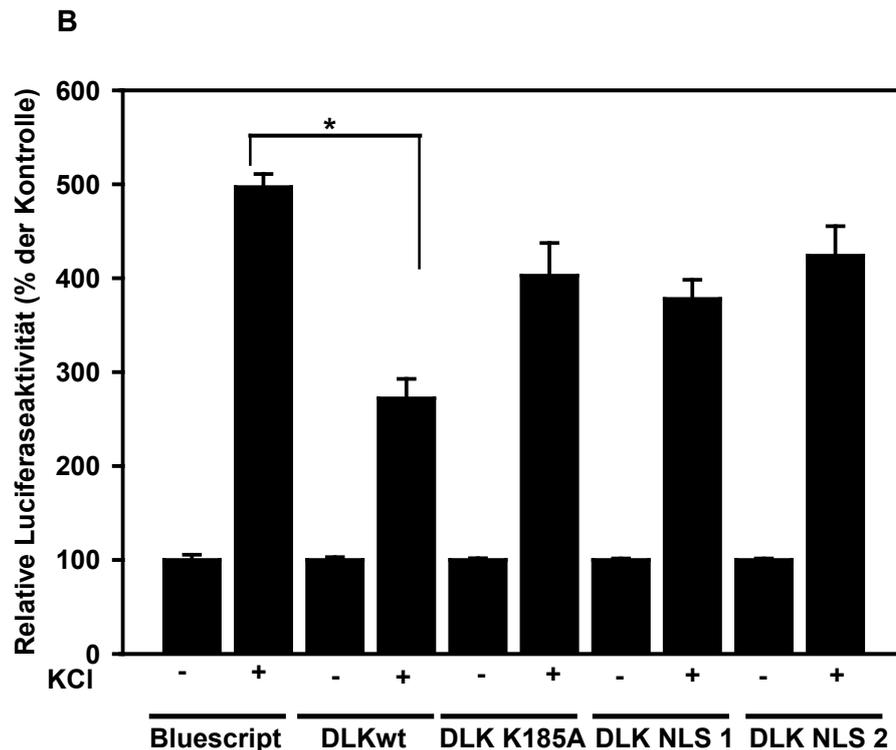


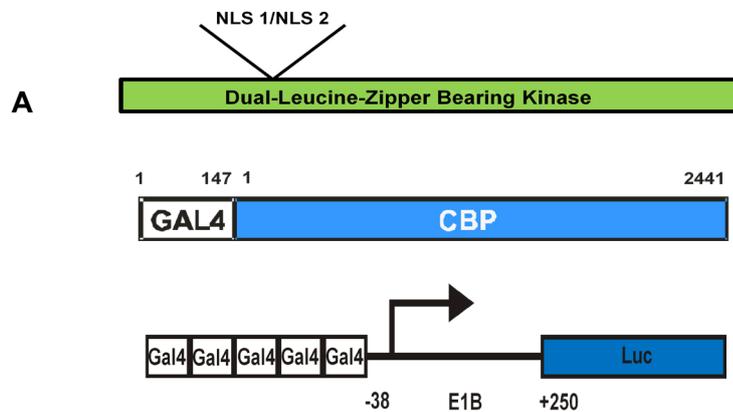
Abb. 3.16: Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CREB. **A** Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf GAL-4-Bindungsdomänen, ein Expressionsvektor für ein GAL4-CREB-Fusionsprotein sowie Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). **B**. Die Behandlung erfolgte, wenn angegeben, mit 40 mM KCl 6 h vor dem Ernten der Zellen. Die Luciferaseaktivität ist als relativer Wert, bezogen auf den Mittelwert der unstimulierten Kontrolle der jeweiligen Gruppe, dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test).

Tab. 3.3: Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CREB unter basalen Bedingungen. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf GAL-4 Bindungsdomänen, ein Expressionsvektor für ein GAL4-CREB-Fusionsprotein sowie Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). Dargestellt ist die prozentuale, GFP korrigierte Luciferaseaktivität (Prozent der basalen Luciferaseaktivität im Vergleich zur Gruppe Bluescript). Basalaktivität = Luciferaseaktivität/GFP. n=6.

Expressionsvektor	Basalaktivität	Standardabweichung SEM
Bluescript (Kontrolle)	100,0	4,6
DLKwt	134,8	11,7
DLK K185A	138,1	15,8
DLK NLS 1	120,0	12,3
DLK NLS 2	136,6	14,3

3.3.5 Einfluss der DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CBP

Um herauszufinden, ob die DLK-NLS-Mutanten Einfluss auf den CREB Koaktivator CBP haben, wurde ein Expressionsvektor für ein GAL4–CBP-Fusionsprotein zusammen mit einem GAL4-Luciferase-Reportergen in die Zellen transient transfiziert (vgl. Abb. 3.17 A). Der Abb. 3.17 B kann entnommen werden, dass eine Depolarisation der Zellmembran zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität von CBP um den Faktor 3,6 führte. Überexpression des DLK-Wildtyps führte zu einer deutlichen Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CBP. Sowohl die Überexpression von DLK K185A als auch die der DLK-Mutanten NLS 1 und NLS 2 führten zu keiner Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CBP. Die Transfektion der Expressionsvektoren für DLKwt und ihrer Mutanten führten zu keiner Veränderung der basalen transkriptionellen Aktivität von CBP (siehe Tab. 3.4).



3. Ergebnisse

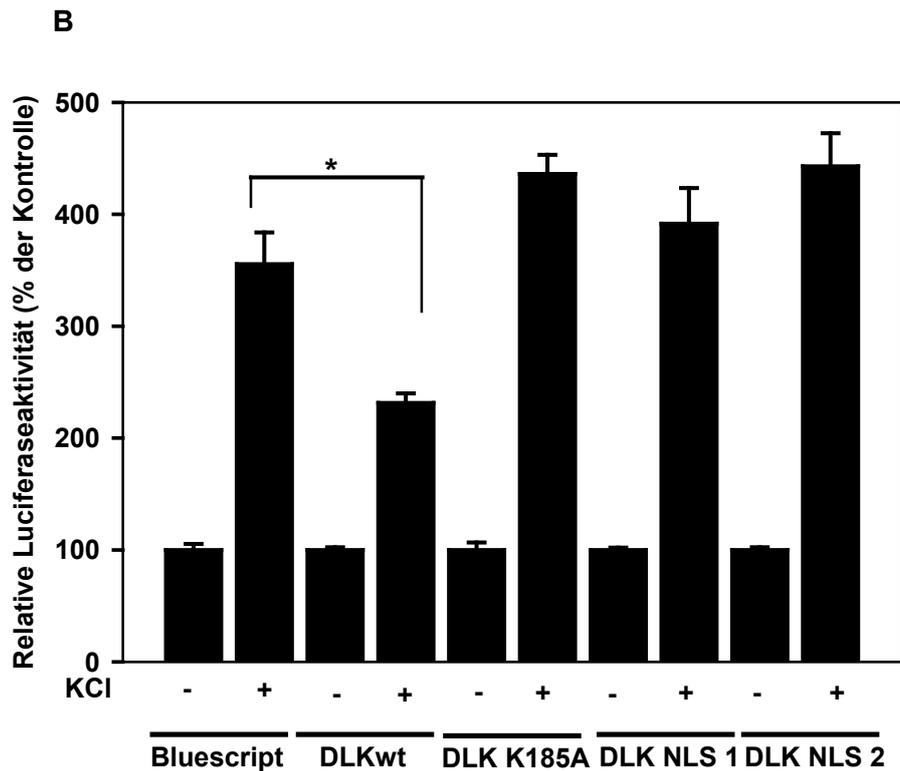


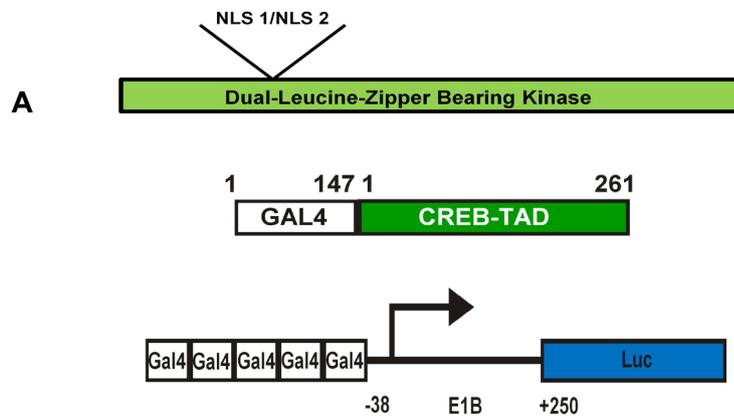
Abb. 3.17: Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität CBP. A Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf GAL-4 Bindungsdomänen, ein Expressionsvektor für ein GAL4-CBP-Fusionsprotein sowie Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). B. Die Behandlung erfolgte, wenn angegeben, mit 40 mM KCl 6 h vor dem Ernten der Zellen. Die Luciferaseaktivität ist als relativer Wert, bezogen auf den Mittelwert der unstimulierten Kontrolle der jeweiligen Gruppe, dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test).

Tab. 3.4: Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von CBP unter basalen Bedingungen. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf GAL-4 Bindungsdomänen, ein Expressionsvektor für ein GAL4-CBP-Fusionsprotein sowie Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). Dargestellt ist die prozentuale, GFP korrigierte Luciferaseaktivität (Prozent der basalen Luciferaseaktivität im Vergleich zur Gruppe Bluescript). Basalaktivität = Luciferaseaktivität/GFP. n=6

Expressionsvektor	Basalaktivität	Standardabweichung SEM
Bluescript (Kontrolle)	100,0	0,8
DLKwt	104,7	10,9
DLK K185A	99,9	8,1
DLK NLS 1	91,3	3,7
DLK NLS 2	105,4	5,0

3.3.6 Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität der CREB-Transaktivierungsdomäne

In analoger Weise zu den oben dargestellten Luciferase-Assays wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die Transaktivierungsdomäne von CREB (CREB-TAD) untersucht wurde. Es kamen dazu die in Abb. 3.18 A dargestellten Konstrukte zur Anwendung. Eine Membrandepolarisation der HIT-Zellen führte zu einer Steigerung der CREB-TAD-abhängigen Gentranskription um den Faktor 5,2. Die DLK-NLS-Mutanten hatten ebenso wenig wie die DLK K185A und der DLK-Wildtyp Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der Transaktivierungsdomäne von CREB (Abb. 3.18 B). Tab. 3.5 zeigt die Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die basale Aktivität der Transaktivierungsdomäne von CREB.



3. Ergebnisse

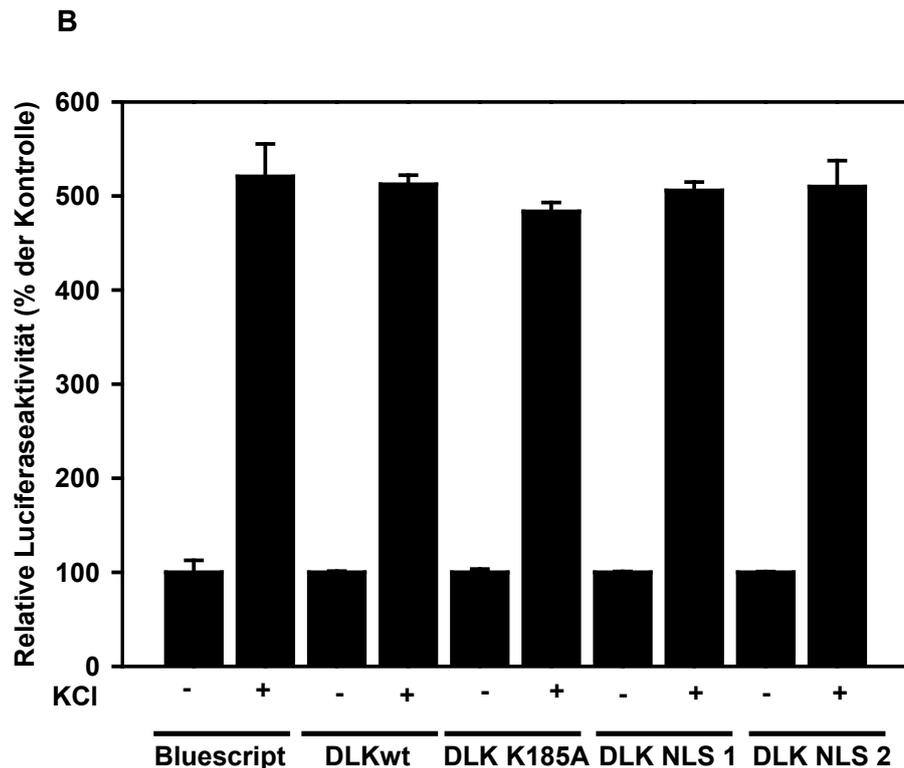


Abb. 3.18: Auswirkung der DLK-NLS-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität der CREB-Transaktivierungsdomäne. **A** Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Transfiziert wurden ein Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf GAL-4-Bindungsdomänen, ein Expressionsvektor für ein GAL4-CREB-TAD-Fusionsprotein sowie Expressionsvektoren für pBluescript, DLKwt bzw. die DLK-Mutanten DLK NLS 1, DLK NLS 2, DLK K185A (jeweils 2 µg DNA/Schale). **B**. Die Behandlung erfolgte, wenn angegeben, mit 40 mM KCl 6 h vor dem Ernten der Zellen. Die Luciferaseaktivität ist als relativer Wert, bezogen auf den Mittelwert der unstimulierten Kontrolle der jeweiligen Gruppe, dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=4).

Tab. 3.5: Auswirkung der DLK und ihrer Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität der CREB-Transaktivierungsdomäne unter basalen Bedingungen. Dargestellt ist die prozentuale, GFP korrigierte Luciferaseaktivität (Prozent der basalen Luciferaseaktivität im Vergleich zur Gruppe Bluescript). Basalaktivität = Luciferaseaktivität/GFP. n=4

Expressionsvektor	Basalaktivität	Standardabweichung SEM
Bluescript (Kontrolle)	100,0	8,1
DLKwt	98,0	12,0
DLK K185A	127,8	14,4
DLK NLS 1	104,3	10,3
DLK NLS 2	122,2	11,4

3.4 Auswirkung der DLK-Mutanten auf die Apoptoserate der Beta-Zellen

Um den Effekt der hergestellten DLK-NLS-Mutanten auf die Beta-Zell-Apoptose zu untersuchen, wurde die Fragmentierung der Caspase-3 nach transients Transfektion von DLKwt, DLK K185A, DLK NLS 1 oder DLK NLS 2 untersucht. Es schloss sich eine immunzytochemische Doppelfärbung zur Detektion der überexprimierten DLK sowie der apoptotischen Zellen, welche durch fragmentierte Caspase-3 angezeigt wurden, an. Die Abb. 3.19 zeigt Bilder eines identischen Bildausschnitts mit Anti-FLAG-Färbung, Durchlichtbild, Anti-cleaved-Caspase-3- und ein Überlagerungsbild. Für das quantitative Ergebnis wurde der prozentuale Anteil der Caspase-3 positiven Zellen an der Gesamtheit der DLK-positiven Zellen ermittelt. Die spontane Apoptoserate in HIT-Zellen betrug $3\% \pm 0,5$ (Plauman et al. 2008). Die Auswertung der drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimente zeigt, dass sowohl die Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A ($3,8\% \pm 0,8$) als auch die der DLK-NLS-1- ($7,0\% \pm 2,1$) und der DLK-NLS-2-Mutanten ($6,2\% \pm 2,5$) zu einer signifikant geringeren Apoptoserate, verglichen mit der Überexpression von DLK-Wildtyp ($18,8\% \pm 2,7$, $n=6$), führten (Abb. 3.20).

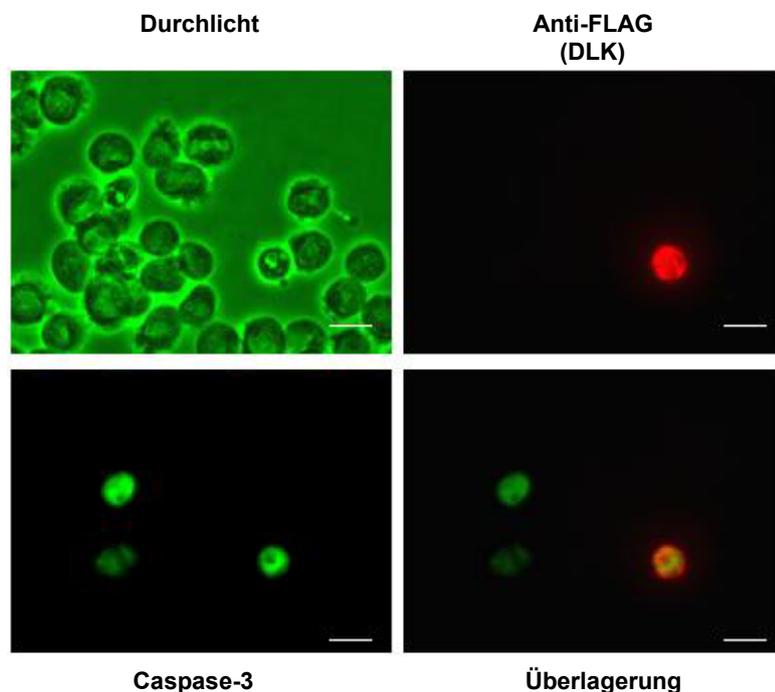


Abb. 3.19: Immunzytochemische Doppelfärbung von HIT-Zellen mit Anti-FLAG-M2 (rot) und Anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper (grün). Exemplarisches Bild von HIT-Zellen nach transients Transfektion mit einem Expressionsvektor für DLKwt (2 µg/Schale) mittels METAFECTENE® und anschließender Inkubation der Zellen für 48 h. Oben links sind die Zellen im Durchlicht zu sehen. Desweiteren ist eine Anti-FLAG-Färbung (DLK), eine fragmentierte-Caspase-3-Färbung und ein Überlagerungsbild dargestellt. Der weiße Balken entspricht 20 µm.

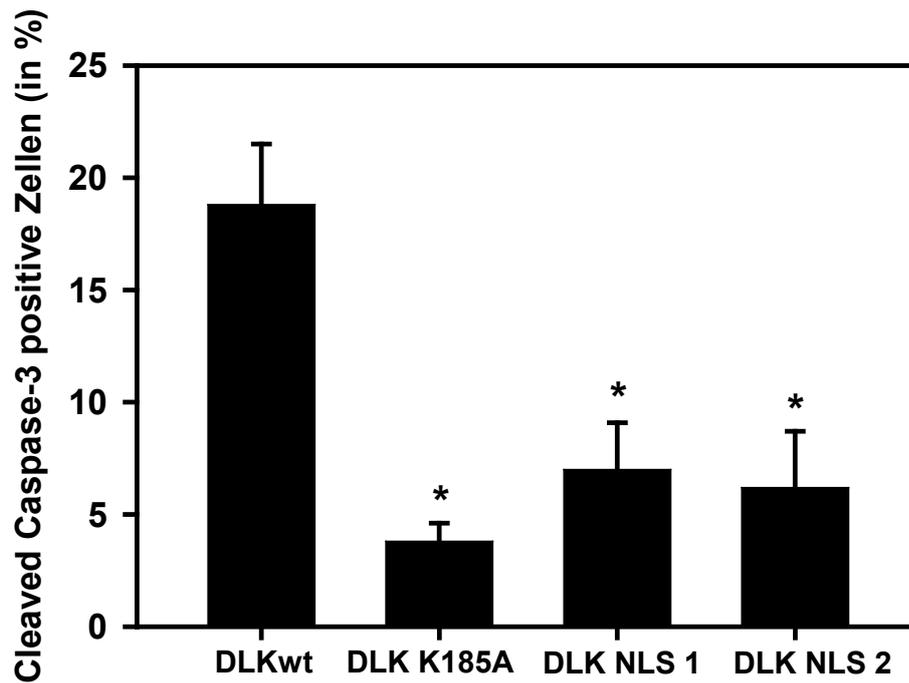


Abb. 3.20: Auswirkung der NLS-Mutanten auf die Beta-Zell-Apoptose. HIT-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für DLKwt bzw. für ihre Mutanten DLK K185A, DLK NLS1, DLK NLS2 transfiziert (2 µg DNA/Schale). Gezeigt ist die quantitative Auswertung der cleaved-Caspase-3-positiven HIT-Zellen. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil der fragmentierten-Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtheit aller mit DLK transfizierten Zellen wieder. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test) versus Gruppe DLKwt.

4. Diskussion

4.1 Die subzelluläre Lokalisation der DLK innerhalb einer Beta-Zelllinie

Der Diabetes mellitus Typ II ist eine Volkskrankheit von enormer gesellschaftlicher und wirtschaftlicher Bedeutung. Die steigende Inzidenz sowie die schwerwiegenden Spätkomplikationen machen die Erkrankung zu einem wichtigen Ziel der medizinischen Forschung.

Man geht heute davon aus, dass die Pathogenese der Erkrankung sowohl durch eine periphere Insulinresistenz als auch durch eine Beta-Zelldysfunktion charakterisiert ist. Beide Komponenten der Erkrankung sind schon in frühen, klinisch noch nicht manifesten Stadien nachzuweisen. Während die Insulinsekretion der Beta-Zellen durch orale Antidiabetika, wie z.B. Sulfonylharnstoffe oder DDP-IV (Dipeptidylpeptidase-4)-Inhibitoren gesteigert werden kann und somit die periphere Insulinresistenz teilweise überwunden werden kann, ist der kontinuierliche Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse zurzeit noch nicht durch die moderne Medizin in suffizienter Weise aufzuhalten. Jener Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse bedingt die im Verlauf der Erkrankung einsetzende Irreversibilität des Diabetes mellitus Typ II.

Zu Beginn der Erkrankung kann der erhöhte Insulinbedarf des Körpers durch kompensatorische Mechanismen der Beta-Zellen ausgeglichen werden. Erst der im Verlauf einsetzende Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse lässt den Diabetes mellitus Typ II symptomatisch werden und führt zum Vollbild der Erkrankung.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine an der Beta-Zelldysregulation während der Pathogenese des Diabetes mellitus beteiligt sind (Donath et al. 2003; Kahn et al. 2006, Hotamisligil, 2006). Diese Sichtweise der Wissenschaft wurde lange Zeit lediglich für den Typ-I-Diabetes diskutiert. In den letzten Jahren mehrten sich verschiedene Hinweise darauf, dass bestimmte Zytokine auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ II einnehmen könnten (Maedler et al. 2004; Donath et al. 2005; Shoelson et al. 2006; Larsen et al. 2007; Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Es existieren jedoch auch gegenteilige Beobachtungen von verschiedenen Autoren, die eine Beteiligung von Zytokinen an der Pathogenese des Diabetes Typ II für unwahrscheinlich halten (Cnop et al. 2005; Welsh et al 2005). Cnop et al. (2005) postulierten, dass Ernährungsfaktoren in der Pathogenese des Diabetes Typ II über einen Zytokin-unabhängigen Mechanismus zum Beta-Zelltod führen. Obwohl diese Arbeitsgruppen Zweifel an einer Beteiligung von Zytokinen an der Pathogenese des Diabetes Typ II äußern, ist es vor dem Hintergrund der sich mehrenden Ergebnisse, die für eine Involvierung von Zytokinen

in die Pathogenese des Diabetes Typ II sprechen, notwendig, eine Sichtweise, die beide Diabetesformen strikt trennt, in Frage zu stellen. Von der Vielzahl der Mediatoren scheinen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β eine tragende Rolle in dem Entstehungsprozess des Diabetes Typ II zu spielen (Maedler et al. 2004; Donath et al. 2003; 2005; 2008; Shoelson et al. 2006; Spranger et al. 2003; Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Diese Zytokine werden im prädiabetischen Zustand verstärkt sezerniert und sind in der Lage, verschiedene Signalwege in der Beta-Zelle zu aktivieren. Zu einem von ihnen aktivierten Signalweg zählt der MAP-Kinase-Weg, welcher in einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK mündet. Aktiviertes JNK führt zu einer Steigerung der Apoptoserate in den Beta-Zellen und ist somit in die Pathogenese des Diabetes mellitus involviert (Rhodes 2005). Die übergeordnete MAP3-Kinase DLK wird durch das Zytokin TNF- α aktiviert und ist als JNK-Aktivator identifiziert worden (Befunde meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Dass die DLK eine Funktion in der Signalweiterleitung von Zytokinen hin zu einer Aktivierung von JNK besitzen könnte, lässt sich aus der Kombination dieser beiden Aspekte ableiten. Zusammenfassend exponieren diese Befunde die DLK zu einem Kandidaten, welcher eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II spielen könnte. Ihre funktionelle Rolle für die Pathogenese des Diabetes mellitus ist jedoch erst lückenhaft erschlossen und bedarf weiterer Charakterisierung. Die vorliegende Arbeit diene der Untersuchung der subzellulären Lokalisation der DLK in HIT-Zellen und sollte den Einfluss der Kompartimentierung der DLK auf Funktionen der Beta-Zell hin untersuchen.

Die klassische Vorstellung über den MAP-Kinase-Weg geht davon aus, dass aktivierte MAP3-Kinasen über die Aktivierung von MAP2-Kinasen zu einer Phosphorylierung von MAP-Kinasen führen (Chang L & Karin 2001). Die daraufhin aktivierten MAP-Kinasen bilden schließlich die Effektormoleküle dieses Signalweges und sind an der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Im aktivierten Zustand gelangen sie durch Translokation in den Kern und sind an der Transkriptionsregulation einer Reihe von Genen beteiligt (Chang L & Karin 2001). Diese Hypothese geht davon aus, dass die höher geschalteten Kinasen zytoplasmatisch lokalisiert sind und Funktionen der Signalverarbeitung, -weiterleitung und -amplifikation übernehmen. Verschiedene Komponenten des MAP-Kinase-Wegs sind innerhalb der Zelle zu spezifischen Proteinkomplexen zusammengefasst. Die einzelnen Komponenten des MAP-Kinase-Wegs interagieren durch direkte Wechselwirkungen miteinander. Zusätzlich schaffen Adapterproteine dabei die Orientierung und ermöglichen die räumliche Nähe für eine Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten.

Kompartimentierung von Proteinkinasen sowie deren Translokation zwischen verschiedenen Zellkompartimenten könnte ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Kinasen sein, durch den sie Zugang zu ihren spezifischen Substraten erlangen (Merritt et al. 1999; Mochly-

Rosen 1995). Es wurde bei mehreren Proteinkinasen beobachtet, dass sie, einem zellulären Stimulus folgend, innerhalb der Zelle translozieren und an spezifische Ankerproteine binden, spezifischen Zugang zu ihrem Substrat erlangen und somit ihre physiologische Funktion ausüben können (Mata et al. 1996).

Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass auch höher geschaltete Kinasen des MAP-Kinase-Wegs in der Lage sind, in den Kern zu translozieren (Fanger et al. 1997; See et al. 2001; Hébert et al. 2000; Merritt et al. 1999; Reddy et al. 1999). Ob sie dort physiologische Funktionen für die Zelle erfüllen, bleibt derzeit unbeantwortet. So konnten Fanger et al. (1997) z.B. für die MAP3-Kinase MEKK1 zeigen, dass sie in COS-Zellen unter basalen Bedingungen sowohl zytoplasmatisch als auch teilweise nukleär lokalisiert ist. Eine nukleäre Lokalisation von MEKK1 konnte ebenfalls in U2OS-Zellen durch See et al. (2001) nachgewiesen werden. Die Menge von MEKK1 im Kern war bei dieser Untersuchung interessanterweise abhängig vom Aktivierungszustand der MAP3-Kinase. Die Autoren postulierten, dass es ein gängiger Mechanismus sein könnte, durch den MEKK1 durch Translokation in den Kern eine direkte Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren ausübt und somit in die Regulation der Transkription eingreifen könnte. Die Regulation der Transkription durch MEKK1 könnte dabei unabhängig von ihrer Downstream Kinase JNK erfolgen.

Auch für die MAP3-Kinase DLK wurden bereits durch andere Autoren Aussagen über ihre subzelluläre Lokalisation in verschiedenen Zellarten gemacht. Zusammenfassend zeigen alle diese vorherigen Untersuchungen zur Lokalisation der DLK, dass diese Proteinkinase eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung, abhängig vom untersuchten Zelltyp, aufweist (Hébert et al. 2000; Douziech et al. 1999; Merritt et al. 1999; Reddy et al. 1999). Um die DLK besser zu charakterisieren, war es von großem Interesse, die Verteilung der DLK innerhalb von Beta-Zellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde sich für die vorliegende Arbeit eines Modells einer insulinproduzierenden Beta-Zelllinie bedient. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Beta-Zelllinie HIT-T15 wichtige Eigenschaften, wie beispielsweise die elektrische Erregbarkeit, ihres Ursprungsgewebes aufweist und somit Rückschlüsse auf das Verhalten von normalen Beta-Zellen zulässt (Santerre et al. 1981; Schwaninger et al. 1993a und 1993b; Oetjen et al. 1994). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die HIT-Zellen über einen intakten Proteinsyntheseapparat verfügen und in der Lage sind, Insulin zu sezernieren (Santerre et al. 1981). Desweiteren sind Untersuchungen in HIT-Zellen zum Transkriptionsfaktor CREB gemacht worden (Oetjen et al. 2006). Für die Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der DLK sowie zur Analyse des Einflusses der unterschiedlichen Lokalisation der DLK auf zelluläre Funktionen, stellte diese Zelllinie somit ein geeignetes zelluläres Modell dar. Dieses Modellsystem diente außerdem dazu, Auswirkungen von Zytokinen und der DLK auf die Funktion sowie auf das Überleben von Beta-Zellen zu untersuchen. Die Un-

tersuchungen an HIT-Zellen lieferten somit wertvolle Daten, die dazu beitragen könnten, die Pathogenese des Diabetes Typ II und die damit verbundene Abnahme der funktionellen Beta-Zellmasse besser zu verstehen. Einschränkend muss man bei den HIT-Zellen jedoch zur Kenntnis nehmen, dass Tumorzelllinien im Allgemeinen unterschiedliche Verhaltensweisen in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose sowie veränderte zelluläre Stoffwechselfvorgänge aufweisen, welches eine uneingeschränkte Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse nicht zulässt. Diese Einschränkung wurde für die vorliegende Arbeit in Kauf genommen, da sich im Hinblick auf Kultivierung und Transfektion der HIT-Zellen deutlich bessere Ergebnisse erzielen lassen als bei Verwendung von primären Beta-Zellen.

Zur Lokalisation der DLK lassen sich bereits Daten aus der Literatur zusammenfassen. In früheren Untersuchungen konnte die DLK in Nervenzellen, im Zytosol sowie an Plasmamembranen gebunden nachgewiesen werden (Merritt et al. 1999, Mata et al. 1996; Hébert et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Methoden zur Identifizierung der subzellulären Lokalisation der DLK zum Einsatz. Die Immunfluoreszenzmikroskopie der HIT-Zellen diente der ersten Analyse der DLK-Distribution. Es handelte sich dabei um eine geeignete Methode, um das Verteilungsmuster der DLK in HIT-Zellen an einer großen Stichprobe möglichst schnell und präzise zu überprüfen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte unter basalen Bedingungen die weitaus größte Menge an DLK im Zytoplasma der HIT-Zellen detektiert werden. 68 % der endogenen DLK und 77 % der überexprimierten DLK waren ausschließlich im Zytoplasma der HIT-Zellen lokalisiert. Die Erkenntnis der zytoplasmatischen Lokalisation der DLK in HIT-Zellen steht somit im Einklang mit den bereits gewonnenen Ergebnissen in anderen Zelllinien (Merritt et al. 1999, Mata et al. 1996; Hébert et al. 2000; Douziech et al. 1999). In den jeweiligen Kompartimenten besitzt die DLK vermutlich unterschiedliche biochemische Eigenschaften: In der Fraktion der synaptischen Plasmamembran von Nervenzellen aus Rattengehirnen wurde die DLK in einem dephosphorylierten Zustand detektiert, während zytoplasmatisch ebenfalls eine phosphorylierte Form der DLK existiert (Mata et al. 1996). Um einen Aussage über den Aktivitätszustands der beiden Formen machen zu können, analysierten Mata et al. (1996) die Kinase-inaktive Mutante DLK K185A in COS7-Zellen und stellten fest, dass sie in einem unphosphorylierten Zustand vorlag. Die Autoren folgerten daraus, dass die katalytisch inaktive Form der DLK membranassoziiert vorliegt, während die katalytisch aktive DLK im Zytoplasma vorliegt (Mata et al. 1996). In NIH 3T3- sowie in COS1-Zellen wurde darüber hinaus eine Assoziation der DLK mit dem Golgi-Apparat beschrieben (Douziech et al. 1999; Hébert et al. 2000; Hirai et al. 2002). Hirai et al. (2002, 2005) stellten innerhalb von Nervenzellen ebenfalls eine Lokalisation der DLK/MUK/ZPK (siehe Kap. 1.7) vor allem an Mikrotubuli von Axonen, fest.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels Elektronenmikroskopie erstmals gewonnenen ultrastrukturellen Daten zur Lokalisation der DLK in der insulinproduzierenden Beta-Zelllinie HIT-T15 trugen zur weiteren Aufklärung der subzellulären Distribution der DLK bei. Dabei erreichte die Elektronenmikroskopie ein sehr hohes Maß an Auflösung und erlaubte eine genaue Beschreibung der Proteinverteilung. Es konnte dadurch ebenfalls gezeigt werden, dass die DLK sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert war. Dies entspricht dem elektronenmikroskopisch erhobenen subzellulären Verteilungsmuster der DLK in der Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 (Hébert et al. 2000). Zusätzlich ließ sich durch morphologische Betrachtung der elektronenmikroskopischen Bilder ableiten, dass die DLK innerhalb des Zytosols verstärkt membranassoziiert vorlag. Eine vorliegende Membranassoziation der DLK, sowohl an der Plasmamembran als auch an intrazellulären Membranen, findet Konsens in bereits getroffenen Aussagen anderer Autoren (Mata et al. 1996; Douziech et al. 1999; Hébert et al. 2000). Weiterführende Untersuchungen werden notwendig sein, um zu klären, ob die DLK mit bestimmten Membranproteinen, wie z.B. den Zytokinrezeptoren, kolokalisiert vorliegt. Den Daten von Mata et al. (1996) zufolge liegt die DLK in unphosphorylierter Form an der Plasmamembran gebunden vor, während sie zytoplasmatisch größtenteils phosphoryliert vorkommt. Die Tatsache, dass das Zytokin TNF- α zu einer Aktivierung der DLK führt (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht) und die DLK an Membranen gebunden zu sein scheint, lenkt den Verdacht darauf, dass die DLK mit dem TNF- α -Rezeptor membranär kolokalisiert vorliegen könnte. So ist es denkbar, dass die DLK durch Aktivierung des TNF- α -Rezeptors aktiviert wird und von der Membran ins Zytoplasma dissoziiert.

Interessanterweise konnte die DLK ebenfalls im neuronalen Zellkern von Rattengehirnen, Nervenzellen vom Ratten Nervus Ischiadicus sowie einer Fibroblasten-Zelllinie (NIH 3T3) detektiert werden (Hébert et al. 2000; Merritt et al. 1999). Das humane Homolog der DLK, die ZPK, wurde durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von intakten NIH-3T3-Zellen vornehmlich im Kern, aber teilweise auch im Zytosol lokalisiert, vorgefunden (Reddy et al. 1999). Diese Befunde gaben Anlass, eine insulinproduzierende Beta-Zelllinie auf eine nukleäre Lokalisation der DLK hinreichend zu untersuchen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte unter basalen Bedingungen ein geringer Anteil an DLK im Nukleus der HIT-Zellen vorgefunden werden (siehe Abb 3.4). Das Vorfinden der DLK im Zellkern der HIT-Zellen steht somit im Einklang mit den Untersuchungen in anderen Zelllinien (Hébert et al. 2000; Merritt et al. 1999; Reddy et al. 1999). Die nur geringe Kernlokalisation der DLK ließ die Vermutung nach einer Regulation des Kerntransportes für diese Kinase aufkommen. Die nukleäre Lokalisation der DLK in Nervenzellen des Nervus Ischiadicus von Ratten konnte bei der Untersuchung durch einen Stimulus induziert werden: Eine Durchtrennung des Axons löste eine Translokation der vornehmlich zytoplasmatisch lokalisierten DLK in den

Zellkern aus (Merritt et al. 1999). Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation der DLK in HIT-Zellen durch den Einfluss eines zellulären Stimulus beeinflusst werden kann. Eine Behandlung mit den vermutlich in die Pathogenese des Diabetes Typ II involvierten Zytokinen TNF- α und IL-1 β führt zu einer signifikanten Akkumulation der vornehmlich zytoplasmatischen DLK im Kern. In mehr als der Hälfte der transfizierten Zellen akkumulierte der DLK-Wildtyp nach 60-minütiger Zytokinbehandlung im Zellkern und zeigte ein panzelluläres Verteilungsmuster. So stieg der Anteil von Zellen mit überexprimierter DLK im Kern, ermittelt durch die Immunfluoreszenzmikroskopie, nach 60-minütiger TNF- α -Behandlung von 23 % auf 62 % bzw. auf 61 % nach Behandlung mit IL-1 β . Diese Ergebnisse zur Translokation der DLK konnten qualitativ durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie sowie der Fraktionierung von HIT-Zellen verifiziert werden (vgl. Kap. 3.1.3 & 3.1.4).

Die durch Merritt et al. (1999) in Nervenzellen von Ratten sowie die in der vorliegenden Arbeit an HIT-Zellen erhobenen Daten sprechen dafür, dass eine moderate nukleäre DLK-Lokalisation durch einen zellulären Stimulus vermehrt werden kann. Der für diese Arbeit gewählte Stimulus wurde durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β repräsentiert, die eine potentiell bedeutende Rolle in der Pathogenese des Diabetes Typ II einnehmen, den MAP-Kinase-Weg in ihre Signalweiterleitung involvieren und dadurch Auswirkungen auf Beta-Zellen ausüben können (Larsen et al 1998; Welsh et al. 1996; Maedler et al. 2001b, 2002; Andersen et al. 2000; Ishizuka et al. 1999; Chang I et al. 2003; Parkash et al. 2005; Donath et al. 2003; Befunde meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Sie sind Gegenstand zahlreicher aktuellen Untersuchungen zur Pathogenese des Diabetes Typ II und wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um deren Auswirkungen auf die Lokalisation der DLK zu überprüfen (Rhodes 2005; Donath et al. 2005; Plomgaard et al. 2007; Maedler et al. 2002; Larsen et al. 2007). Beide Zytokine scheinen in ähnlicher Weise eine Akkumulation der DLK im Kern zu bedingen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine gewisse Konzentration von DLK unter basalen Bedingungen im Zellkern der HIT-Zellen vorliegt und eine nukleäre Akkumulation durch Behandlung mit TNF- α und IL-1 β verstärkt wird. Eine Aktivierung der DLK durch Phosphorylierung durch das Zytokin TNF- α konnte in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Es ist jedoch noch nicht gesichert, ob die Translokation der DLK in den Kern eine Aktivierung der DLK voraussetzt oder ob die Translokation der DLK unabhängig von der Aktivierung durch Phosphorylierung ist. Die durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung unter Verwendung der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A lieferte Hinweise darauf, dass eine Kernakkumulation der DLK unabhängig von der ATP-Bindung der DLK zu sein scheint und somit auch weitestgehend unabhängig vom Aktivierungszustand der DLK ist. Die Kinase-inkative

Mutante zeigte unter Einfluss von TNF- α ebenfalls eine verstärkte Kernakkumulation. Es sind somit zwei Möglichkeiten zur Induktion einer nukleären DLK-Lokalisation denkbar, die durch Abb. 4.2 skizziert werden. Beide Hypothesen gehen davon aus, dass sich die DLK unter basalen Bedingungen vorwiegend im Zytosol befindet. Die DLK liegt unter basalen Bedingungen als Monomer unphosphoryliert und in inaktiver Form an ihrem Adapterprotein JIP gebunden vor. Durch Stimulation dieses Proteinkomplexes kommt es zu einer Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein sowie zu einer Homodimerisierung und vermutlich anschließenden Autophosphorylierung der DLK (Nihalani et al. 2001). Eine denkbare Hypothese wäre, dass es unter Einfluss der Zytokine TNF- α und IL-1 β über eine Aktivierung von JNK zu einer Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein JIP in das Zytosol kommt. Die freigesetzte DLK wäre anschließend in der Lage, mit Hilfe ihrer Kernerkenntnissequenz die Kernmembran zu überwinden und in den Kern zu gelangen. Ein weiterer möglicher Mechanismus, der zu einer Akkumulation der DLK im Nukleus der Zelle führen könnte, ist vermutlich durch eine direkte Aktivierung der Kernerkenntnissequenz der DLK durch die beiden Zytokine gekennzeichnet. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch nicht bekannt. Ein Beispiel aus der Literatur soll potentiell mögliche Mechanismen einer derartigen Aktivierung skizzieren.

Für den Transkriptionsfaktor NFAT1 konnte gezeigt werden, dass er zwei Kernerkenntnissequenzen besitzt, von denen eine dieser Sequenzen eine intramolekulare Assoziation mit phosphorylierten Serinen aufweist (Beals et al. 1997). Die Dephosphorylierung dieser Serine durch Calcineurin führt zu einer Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors, bei der es zu einer Freilegung der Kernerkenntnissequenzen sowie zu einer nukleären Lokalisation von NFAT1 kommt (Okamura et al. 2000). Sowohl intramolekulare Konformationsänderungen, bei denen es zur Freilegung der Kernerkenntnissequenz kommen könnte als auch Änderungen im Phosphorylierungszustand sind auch für die DLK denkbare Mechanismen, die zu einer Aktivierung ihrer Kernerkenntnissequenz führen könnten. Eine Aktivierung der Kernerkenntnissequenz würde dabei an bereits frei im Zytoplasma vorliegenden Formen der DLK stattfinden. Die Translokation der DLK scheint sowohl in Nervenzellen als auch in HIT-Zellen sehr schnell vor sich zu gehen (Merritt et al. 1999). Diese Tatsache legt den Verdacht nahe, dass die Translokation der DLK in den Kern aus einem bereits existierenden zytoplasmatischen Proteinpool vollzogen wird. Zusammen mit den Ergebnissen zur Translokation der DLK in Nervenzellen, geben diese Daten einen starken Hinweis darauf, dass proinflammatorische Zytokine zu einer Akkumulation der DLK im Zellkern führen. Dieser Mechanismus könnte der schnellen Adaptation der Zelle auf veränderte extrazelluläre Bedingungen dienen. Die Kernakkumulation der DLK, ausgelöst durch zwei Zytokine mit unterschiedlichen Rezeptoren, lässt die Vermutung nach einem generellen Mechanismus auf-

kommen, der für die Regulation und Weiterleitung von Zytokinsignalkaskaden in Beta-Zellen eine potentielle Rolle spielen könnte. Obwohl auch die MAP3-Kinase MEKK1 in Nukleus von Zellen vorgefunden wurde, ist es nicht bekannt, ob eine Stimulus-induzierte nukleäre Translokation einen generellen Mechanismus von MAP3-Kinasen darstellt. Die Ergebnisse lassen jedoch Spekulationen über kompartiment-spezifische Aufgaben der DLK zu. Ähnlich wie bereits für andere Proteinkinasen beschrieben, könnte die DLK in den unterschiedlichen Zellkompartimenten verschiedene Aufgaben übernehmen und würde somit eine höhere Substratspezifität erlangen. Weiter ist z.B. denkbar, dass die DLK unter basalen zellulären Bedingungen eine Rolle für physiologische Stoffwechselforgänge innerhalb des Zytosols einnimmt. Darüber hinaus könnte sie, ausgelöst durch zellulären Stress, Zugang zu anderen Substraten innerhalb des Kerns erlangen, wo sie an der Vermittlung pathologischer zellulärer Signale beteiligt sein könnte. Eine derartige Überlegung zur Kompartimentierung von Proteinkinasen findet Konsens in vorherigen Untersuchungen zu anderen Komponenten des MAP-Kinase-Wegs (Mochly-Rosen 1995; Chang L & Karin 2001).

Während die apparente Masse der DLK mit 130 kDa beschrieben wurde, ergibt sich rechnerisch für diese Kinase nur eine Masse von ca. 100 kDa (Holzman et al. 1994). Die Daten der vorliegenden Arbeit, die unter Verwendung des DLK-Antikörpers in Western Blot-Analysen von kompletten HIT-Zelllysaten erhoben wurden, zeigten die DLK-repräsentierende Bande bei 130 kDa. Diese Größe entspricht den von Holzman et al. (1994) erhobenen Daten zur Detektion der DLK unter Verwendung des DLK-Antikörpers. Interessanterweise ergaben die Analysen der Zellfraktionierung in der vorliegenden Arbeit eine zusätzliche, starke immunologische Bande innerhalb der Kernfraktion bei ca. 100 kDa. Die Herkunft dieser Bande ist bisher nicht bekannt, jedoch sind in anderen Arbeiten ebenfalls kleinere Fragmente der DLK bei immunologischen Reaktionen aufgefallen (Reddy et al. 1999, Hébert et al. 2000). Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine proteolytische Prozessierung der DLK handeln könne (Reddy et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Antikörper zur immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Detektion der DLK verwendet. Der Anti-FLAG-Antikörper bindet an das FLAG-Epitop, welches am N-terminalen Ende des DLKwt gelegen ist, während der verwendete DLK-Antikörper die 223 C-terminalen Aminosäuren der DLK erkennt. Da die DLK unter Verwendung dieser beiden Antikörper im Zellkern detektiert werden konnte, schließt sich die Vermutung an, dass sich das vollständige DLK-Molekül im Zellkern befindet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass im Kern kleinere Fragmente, sowohl mit N- als auch C-terminalen Enden, der DLK existieren. Ein Mechanismus, der hierbei eine Rolle spielen könnte, ist die für die DLK und ihre Homologe Wallenda (aus *Drosophila*) und DLK-1 (aus *C.elegans*) beschriebene Ubiquitinierung durch sehr große, zytoplasmatisch lokalisierte E3-Ubiquitin-Ligasen (PHR-1, CHIP (HSC70-interacting protein), RPM-1 bzw.

Highwire), welche Ubiquitinreste an die DLK ligieren und sie somit der Degradation im Proteasom zuführen (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Daviau et al. 2006, Lewcock et al. 2007). Ein einzelner Ubiquitinrest besitzt eine Masse von 8,5 kDa. Denkbar wäre hierbei, dass die zytoplasmatisch lokalisierte DLK mehrere Ubiquitinreste trägt (Poly-Ubiquitinierung), während nukleär lokalisierte DLK sich der Ubiquitinierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase entziehen kann und folglich mit der errechneten Masse von 100 kDa migriert. Vorstellbar wäre weiterhin ein Regulationsmechanismus, bei dem eine DLK-spezifische Ubiquitin-Ligase die Aktivität der DLK durch Ubiquitinierung supprimiert und somit einen DLK-vermittelten Beta-Zellverlust minimiert.

Es existieren jedoch auch Hinweise darauf, dass es sich bei der in der Kernfraktion detektierten Bande bei 100 kDa um eine unspezifische Reaktion handeln könnte, da es sich um eine vergleichsweise sehr starke Bande handelt, welche deutlich stärker ist als die DLK-Bande im Zytosol bei 130 kDa. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die DLK mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie hauptsächlich im Zytoplasma detektiert wurde, spricht dieser Befund für eine unspezifische Immunreaktion des DLK-Antikörpers. Ob es sich jedoch bei dieser 100 kDa Bande um eine proteolytische Variante oder um die komplette DLK handelt bzw. wie groß der Anteil dieser Fragmente an der Gesamt DLK-Menge ist und welche Funktion sie übernehmen könnten, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Translokation von Signalmolekülen in den Kern scheint ein essentieller Mechanismus für ihre stimulus-abhängige Funktion und die Regulation von zellulären Prozessen zu sein. Da die DLK ca. 130 kDa schwer ist, aber dennoch im Kern detektiert worden ist, müsste sie über eine Kernerkennungssequenz verfügen, die sie in die Lage versetzt, in den Kern zu gelangen. Es konnte unter Verwendung der Suchmaschine für Proteinprofile MyHits (Hulo et al. 2008) eine Sequenz von zwei basischen Aminosäureclustern (KKVRDLKETDIKHLRKLKH) an der Position AS 185 bis 203 identifiziert werden, welche Ähnlichkeiten zu bereits beschriebenen zweiteiligen Kernerkennungssequenzen besitzt. Die beiden basischen Regionen sind durch ein kurzes Zwischenstück voneinander getrennt. Diese Sequenz liegt innerhalb der katalytischen Domäne der DLK und ist ebenfalls bei ihren Homologen (MUK, ZPK, Wallenda) vorzufinden. Zur Analyse dieser Aminosäuresequenz innerhalb der DLK wurden zwei Mutanten hergestellt. Die veränderten Basen dieser Mutanten lagen in der zu untersuchenden basischen Aminosäuresequenz. Um die Expression der in der vorliegenden Arbeit hergestellten DLK-NLS-Mutanten (DLK NLS 1 & DLK NLS 2), die Mutationen entweder im ersten oder im zweiten Teil der zweiteiligen Kernerkennungssequenz aufwiesen, in den HIT-Zellen zu überprüfen, wurde eine Expressionsanalyse mit DLKwt und DLK K185A als Kontrolle für eine bekannte Expression durchgeführt. Der resultierende Western Blot (Abb. 3.13) zeigte, dass die DLK-Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 in den HIT-Zellen exprimiert

wurden. Anschließend wurden die Mutanten zur Analyse ihrer subzellulären Lokalisation mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierbei zeigten beide Mutanten ein differierendes Verteilungsverhalten innerhalb der Zelle im Vergleich zum DLK-Wildtyp. Während die DLK-NLS-Mutanten unter basalen Bedingungen ebenso wie der DLK-Wildtyp größtenteils zytoplasmatisch lokalisiert waren, zeigten sie im Gegensatz zur deutlichen Translokationseigenschaft des DLKwt höchstens eine moderate Kernakkumulation nach Behandlung mit den Zytokinen TNF- α bzw. IL-1 β (siehe Abb. 3.12). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die erste als auch die zweite basische Sequenz innerhalb der identifizierten Proteinregion für einen suffizienten Kerntransport der DLK notwendig waren und lassen somit den Schluss zu, dass es sich bei der identifizierten Sequenz um eine zweiteilige Kernerkennungssequenz (Bipartite NLS) handelt, die durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β aktiviert werden kann. Die Mechanismen, die zu einer Aktivierung der Kernerkennungssequenz führen, sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Die Interaktion der NLS-Sequenz mit den Importinen scheint jedoch der entscheidende Mechanismus zu sein, der sowohl positiv als auch negativ, z.B. durch Phosphorylierung, beeinflusst werden kann (Jans et al. 2000). Die stets beobachtete geringe Kernlokalisierung der DLK NLS 1 (13,6 % \pm 3,1) und DLK NLS 2 (14,8 % \pm 2,7) lassen sich durch die Bildung von Dimeren erklären. Durch die Bildung von Heterodimeren könnte eine DLK NLS-Mutante mit dem DLK-Wildtyp interagieren und mithilfe der suffizienten Kernerkennungssequenz des DLK-Wildtyps in den Kern geschleust werden. Da beide Mutanten jeweils einen Teil der zweiteiligen Kernerkennungssequenz enthalten, ist es ebenfalls nicht auszuschließen, dass dieser Teil einen schwachen Kerntransport der jeweiligen Mutante vermittelt. Die erhobenen Daten zeigen, dass die durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β induzierte Kernakkumulation der DLK durch die zweiteilige Kernerkennungssequenz der DLK vermittelt wird, da keine suffiziente Kernakkumulation der DLK-NLS-Mutanten durch die verwendeten Zytokine induziert werden konnte. Die Daten machen somit deutlich, dass die DLK eine funktionelle Kernerkennungssequenz besitzt, welche durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β stimuliert werden kann. Darüber hinaus könnte die zweiteilige Kernerkennungssequenz für die DLK einen Schutzmechanismus vor einer Degradation im Zytoplasma darstellen. Die Ubiquitinierung der DLK bzw. ihrer Homologe durch E3-Ubiquitin-Ligasen geschieht vermutlich in Abhängigkeit von ihrem Aktivitätsgrad (Abrams et al 2008). Die unter basalen Bedingungen moderate Ubiquitinierungsrate der DLK könnte daher durch Aktivierung der Kinase drastisch steigen, was zu einer sehr starken Degradation der DLK führen könnte. Durch eine Translokation in den Kern könnte sich die DLK somit ihrem Abbau entziehen. Eine darauf aufbauende Hypothese wäre, dass sich die größtenteils im Zytoplasma lokalisierten DLK-Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 ihrer Degradation durch das Proteasom nach einer erfolgten Aktivierung nicht mehr entziehen könnten. Interessanterweise konnte die DLK NLS

Doppelmutante in der vorliegenden Arbeit nicht in den HIT-Zellen detektiert werden. Vermutlich liegt eine gestörte Expression dieser Mutante vor. Möglicherweise wird diese Mutante jedoch so schnell durch die oben beschriebenen E3-Ubiquitin-Ligasen ubiquitiniert und der Degradation zugeführt, dass sie nicht detektiert werden konnte. Eine Blockierung der zweiten Kernerkenungssequenz könnte zu einer verstärkten Ubiquitinierung und Degradation einer pathologisch aktivierten DLK führen.

4.2 Eine Hemmung der JNK-Aktivierung führt zu einer Verminderung der DLK-Translokation in den Kern

Unter basalen Bedingungen liegt die katalytisch inaktive DLK als Monomer an ihrem Adapterprotein JIP gebunden vor (Nihalani et al. 2001). Durch Stimulus-abhängige Phosphorylierung des Scaffold-Proteins JIP durch die aktivierte MAP-Kinase JNK kommt es zu einer Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein JIP (Nihalani et al. 2003). Daraufhin bildet die DLK Homodimere und wird durch einen Autophosphorylierungsprozess katalytisch aktiv (Nihalani et al. 2001, 2003, 2007). Für eine Phosphorylierung dieser MAP3-Kinase ist eine Dimerisierung der DLK notwendig, während für den Vorgang der Dimerisierung die katalytische Aktivität des Enzyms nicht benötigt wird (Nihalani et al. 2000; Mata et al. 1996). Die aktivierte, phosphorylierte DLK führt dann über die Phosphorylierung von MKK7 bzw. MKK4 zu einer Aktivierung von JNK (Nihalani 2001, 2003, 2007; Merritt et al. 1999; Xu et al. 2005; Gallo und Johnson 2002). Diese Signalamplifikation wird von einigen Autoren als positiver Feedback Mechanismus (Feed-forward loop) (siehe Abb. 4.1) bezeichnet und scheint als Regulationsmechanismus in die Apoptose involviert zu sein (Xu et al. 2005, Nihalani et al. 2007). Ein solcher Regelkreis dient der schnellen Adaptation der Zelle an veränderte extrazelluläre Bedingungen und muss als ein dynamischer Prozess aufgefasst werden. Da gezeigt wurde, dass die DLK in HIT-Zellen durch das Zytokin TNF- α aktiviert werden kann und darüber hinaus als potenter JNK-Aktivator identifiziert werden konnte, könnte sie eine Schlüsselrolle in der Zytokin-vermittelten Zerstörung der funktionellen Beta-Zellmasse einnehmen (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht).

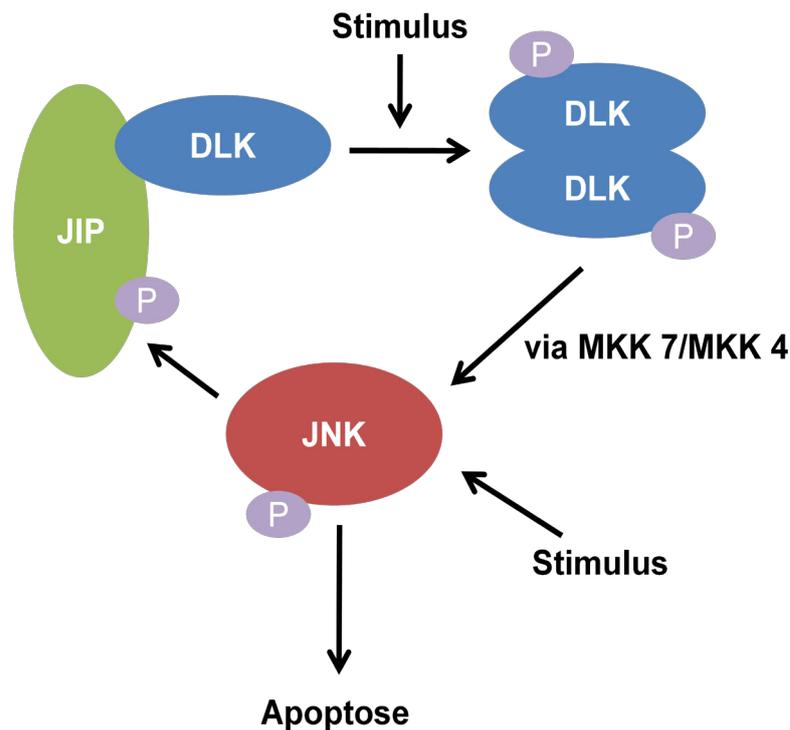


Abb. 4.1 Feed-forward loop – Signalamplifikation der DLK-Aktivierung. Die DLK liegt unter basalen Bedingungen am Adapter-Protein JIP gebunden vor. Durch Phosphorylierung von JIP durch JNK kommt es zur Bildung von DLK-Homodimeren, die sich wahrscheinlich gegenseitig phosphorylieren und somit in den katalytisch aktiven Zustand überführt werden. Aktivierte DLK führt über Phosphorylierung von MKK4 bzw. MKK7 zu einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK. Dieser Signalweg mündet in der Aktivierung der Apoptose. Durch einen adäquaten Stimulus wird JNK aktiviert und an JIP rekrutiert. Die nachfolgende Phosphorylierung von JIP durch JNK führt zu einer vermehrten Dissoziation der DLK aus ihrem inaktiven, an JIP gebundenen Zustand. Dieser Mechanismus stellt eine positive Rückkopplung (Feed-forward loop) der JNK-Signalkaskade dar, in der die DLK eine zentrale Position einnimmt.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich eine Hemmung der JNK-Aktivierung negativ auf die Kernakkumulation der DLK auswirkt. Dabei führt eine Hemmung von JNK durch den JNK-Inhibitor SP600125 zu einer verminderten Kernakkumulation der DLK nach Behandlung mit den Zytokinen TNF- α und IL-1 β (siehe Abb. 3.5). In der Literatur sind JNK-aktivierende Wirkungen der beiden Zytokine TNF- α und IL-1 β beschrieben worden (Donath et al. 2003; Shoelson et al. 2006; Hotamisigilil 2006; Bonny et al. 2001). Aus den erhobenen Daten lässt sich daher ableiten, dass die Aktivierung von JNK und die konsekutiv einsetzende Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein JIP den Weg für eine nukleäre DLK-Akkumulation ebnen könnten. Es ist davon auszugehen, dass eine Aktivierung von JNK über Phosphorylierung von JIP zu einer Dissoziation von zytoplasmatisch lokalisierter, an JIP gebundener DLK führt (Nihalani et al. 2001, 2003). Da die MAP-Kinase JNK eine zentrale Rolle innerhalb der Zytokinsignalkaskade spielt, könnte die Dissoziation und konsekutive Translokation der DLK einen Mechanismus darstellen, der eine Adaptation der HIT-Zellen auf einen extrazellulären Zytokinstimulus darstellt. Der langfristige Einfluss von Zytokinen

könnte somit in eine Steigerung der DLK-induzierten Apoptose münden. Eine Hemmung der zytokin-induzierten JNK-Aktivierung vermindert die Translokation der DLK, kann sie jedoch nicht vollständig unterdrücken. Dies lässt einen zusätzlichen Regulationsmechanismus vermuten, bei dem die Zytokinsignalkaskade die Kernerkennungssequenz der DLK direkt aktiviert und zu einer vermehrten nukleären Akkumulation führt (siehe Abb. 4.2). Es ist dabei nicht geklärt, ob die DLK bei einer Translokation in den Kern als Dimer oder Monomer vorliegen muss.

4.3 Die Apoptose-induzierende Wirkung der DLK auf die Beta-Zelle ist abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation

Zur Analyse der Apoptoserate in den HIT-Zellen wurde als biochemischer Apoptosemarker die Spaltung der Caspase-3 an der Aminosäurestelle Aspartat-175 verwendet (Hengartner 2000). Dadurch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion der DLK zumindest teilweise eine nukleäre Lokalisation der DLK voraussetzt. In vorherigen Studien konnte beschrieben werden, dass die Überexpression des DLK-Wildtyps in einer Beta-Zelllinie zu einer Steigerung der Caspase-3-positiven Zellen von 3 % auf 19 % führt (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht; Plaumann et al. 2008). Plaumann et al. (2008) konnten zeigen, dass die DLK in der Lage ist, die Apoptoserate in Beta-Zellen zu erhöhen, während die Kinase-Totmutante DLK K185A keinen wesentlichen Effekt auf die basale Apoptoserate der Beta-Zellen besaß. Eine Überexpression von DLK-NLS-1- und -NLS-2-Mutanten in der pankreatischen Beta-Zelllinie HIT-T15 führte zwar auch zu einer moderaten Steigerung der Caspase-3-positiven HIT-Zellen, diese war jedoch weit weniger ausgeprägt als durch Überexpression des DLKwt und betrug nur 7 % (DLK NLS 1) bzw. nur 6 % (DLK NLS 2). Eine Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A, welche als Kontrolle eingesetzt wurde, führte zu einer Rate an Caspase-3-positiven HIT-Zellen von 4 % und unterscheidet sich somit nicht von der spontanen Apoptoserate. Es kam durch Überexpression der DLK K185A ebenfalls zu keinem signifikanten Unterschied in der Rate an Caspase-3-positiven Zellen gegenüber der Überexpression von DLK NLS 1 bzw. NLS 2. Den Daten kann entnommen werden, dass die DLK einen Teil ihres apoptose-induzierenden Effektes im Kern ausübt. Eine veränderte Kernerkennungssequenz und somit eine Inhibierung des Kerntransportes der DLK wirkte sich positiv auf das Überleben der Beta-Zelle aus. Es muss jedoch dabei beachtet werden, dass eine Hemmung der katalytischen Domäne ein effektiverer Mechanismus sein könnte, den apoptose-induzierenden Effekt der DLK zu inhibieren. Der Vorteil einer Hemmung der Kernerkennungssequenz gegenüber ei-

ner Hemmung der katalytischen Funktion ist darin zu sehen, dass physiologische Aufgaben der DLK im Zytoplasma der Zelle noch wahrgenommen werden können, sich aber die apoptose-induzierende Wirkung dieser Kinase auf die Beta-Zelle reduzieren lässt. Diese schädliche Wirkung für die Beta-Zelle könnte durch pathologisch aktivierte Signalwege und eine damit verbundene Aktivitätssteigerung der Kinase vermittelt werden. Die Rolle der DLK für die Beta-Zelle könnte daher in einem Gleichgewicht zu sehen sein, beim dem eine pathologisch verstärkte DLK-Aktivität zu einer Abnahme der Beta-Zellmasse führt.

4.4 Mögliche Mechanismen einer DLK-induzierten Apoptose

Vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die DLK einen hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor CREB besitzt (Oetjen et al. 2006). CREB spielt eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung der Beta-Zellfunktion und Betazellmasse (Reddy et al. 1999; Oetjen et al. 2006; Jambal et al. 2003; Jhala et al. 2003).

Die Aktivierung von CREB wird einerseits durch eine Erhöhung an intrazellulärem cAMP und andererseits durch Membrandepolarisations-induziertem Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vermittelt. Der Second Messenger cAMP führt anschließend über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zu einer Phosphorylierung von CREB am Serin 133 (in CREB-341, entspricht Serin 119 in CREB-327) (Mayr & Montminy 2001). Ebenso kommt es durch Einstrom von Calcium sowohl direkt als auch über eine Stimulation der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase zu einer Aktivierung von CREB (Mayr & Montminy 2001). Die Phosphorylierung von CREB erfolgt am Serin 133 nach dessen Bindung an CRE. An diesen Phosphorylierungsprozess von CREB schließt sich über die „Kinase inducible Domain“ (KID) der Transaktivierungsdomäne von CREB die Interaktion mit der KIX-Domäne von CBP an, wodurch die transkriptionelle Aktivität von CREB gesiebert wird (Mayr & Montminy 2001, Kwok et al. 1994). Darüber hinaus ist ein weiterer Koaktivator von CREB beschrieben worden. Es handelt sich dabei um den „Transducer of Regulated CREB“ (TORC) (Screaton et al. 2004). Durch Dephosphorylierung des unter basalen Bedingungen zytoplasmatisch lokalisierten TORC, kommt es zu einer Translokation in den Kern und zu einer Stimulation der CREB-Aktivität durch Interaktion mit der bZIP (Basic Leucine Zipper Domain)- Domäne von CREB (Screaton et al. 2004). Sowohl zellulärer Calcium Einstrom, welcher zu einer verstärkten Aktivität der Phosphatase Calcineurin führt, als auch die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle, welcher die Aktivität der SIK2-Kinase inhibiert, führen zur Dephosphorylierung von TORC (Screaton et al. 2004).

Um den Effekt einer nukleär lokalisierten DLK auf die Funktionen der Beta-Zellen beurteilen zu können, wurden die Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 für Luciferase-Reporter-Gen-Assays sowie für immunzytochemische Untersuchungen zur Apoptose verwendet. Dabei wurde die Auswirkung der größtenteils zytoplasmatisch lokalisierten Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 auf Beta-Zellfunktionen mit denen des DLKwt verglichen. Eine wichtige Voraussetzung für den Aussagewert der Experimente lieferte die gezeigte enzymatische Aktivität der DLK-NLS-Mutanten, welche durch ihre Auswirkung auf die JNK-Phosphorylierung ermittelt wurde (siehe Kap 3.3.2). Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da sich die Mutationen der Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 in unmittelbarer Nachbarschaft zur ATP-Bindungsstelle der DLK befinden (AS 185). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die DLK NLS 1 und NLS 2 ebenso wie der DLKwt und die DLK K185A exprimiert werden (siehe Abb. 3.13). Es kann daraus gefolgert werden, dass differierende Auswirkungen der DLK-NLS-Mutanten auf zelluläre Funktionen im Vergleich zum DLK-Wildtyp auf einer unterschiedlichen Lokalisation beruhen und nicht auf ein Fehlen der katalytischen Aktivität bzw. einer fehlenden Expression der DLK-NLS-Mutanten zurückzuführen sind.

Die vorliegende Studie zeigt, dass sich die negativen Einflüsse der DLK auf die Beta-Zellen zumindest teilweise auf die nukleäre Lokalisation dieser MAP3-Kinase zurückzuführen lassen. Eine Überexpression des DLK-Wildtyps hemmte die stimulierte CRE-/CREB- und CBP-abhängige Gentranskription, während die Überexpression beider DLK-NLS-Mutanten mit veränderter Kernerkenntnissequenz zu keiner Hemmung der CRE- und CBP-abhängigen Gentranskription führten und eine verminderte Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription bewirkten (siehe Kap. 3.3.3-3.3.5). Diese verminderte bzw. fehlende Hemmung durch die DLK-NLS-Mutanten war in ihrem Ausmaß vergleichbar mit der Wirkung der Kinase-inaktiven Mutante DLK K185A, die als Negativ-Kontrolle für eine aufgehobene Hemmung der CRE-/CREB- und CBP-abhängigen Transkription in dem Versuch eingesetzt wurde. Die erhobenen Daten legen die Vermutung nahe, dass der hemmende Effekt auf die CRE-/CREB- und CBP-abhängige Gentranskription zumindest in Teilen durch DLK-vermittelte Mechanismen im Zellkern ausgeübt wird. Es ist weiter davon auszugehen, dass eine Hemmung der Translokation der DLK in den Kern zu einer verminderten Hemmung von CREB führt und somit zu einem verbesserten Überleben der Beta-Zellen. Die daraus resultierende fehlende Hemmung von CREB durch die DLK würde sich somit positiv auf die Insulinentranskription und das Aufrechterhalten der Beta-Zellmasse durch eine verstärkte Transkription der anti-apoptischen Proteine BCL-2 und BCL-xl sowie des für das Beta-Zellüberleben wichtigen IRS-2 auswirken (Jhala et al. 2003; Eliseev et al. 2004). Es sind hierbei mehrere Wirkmechanismen einer nukleär lokalisierten DLK in Bezug auf die Apoptoseinduktion denkbar.

2004 beschrieben Zhou et al. das Serin-436 am CBP, welches durch Phosphorylierung zu einer verminderten Rekrutierung von CBP an CREB und somit zu einer Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription führt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine Phosphorylierung von CBP am Serin-436 durch die DLK, was die beobachtete Hemmung der CRE-/CREB- und CBP-abhängigen Gentranskription erklären könnte.

Desweiteren konnten Reddy et al. (1999) zeigen, dass nukleär lokalisierte ZPK (humanes Homolog der DLK) durch direkte Interaktion mit CREB zu einer Phosphorylierung und somit zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB führt. Aus diesen Befunden lässt sich eine Vermutung über eine Interaktion von CREB und DLK, die zu einer Hemmung der CREB-abhängigen Transkription führt, ableiten.

Sun et al. (1994) konnten zeigen, dass es an CREB neben aktivierenden (Serin-133) auch inhibitorische (Serin-142) Phosphorylierungsstellen gibt, welche die transkriptionelle Aktivität von CREB regulieren. Die inhibierende Phosphorylierungsstelle befindet sich innerhalb der Transaktivierungsdomäne von CREB (CREB-TAD) und stellt ein potentiell Ziel für eine Phosphorylierung durch eine nukleär lokalisierte DLK dar. Dadurch das gezeigt werden konnte, dass eine nukleär lokalisierte DLK zu einer Hemmung der CRE-/CREB- und CBP-abhängigen Transkription führte, kam die Vermutung einer inhibitorischen Phosphorylierung von CREB durch die DLK auf. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass weder der DLK-Wildtyp noch die DLK-Mutanten DLK K185A, DLK NLS 1 und DLK NLS 2 einen Einfluss auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CREB-TAD-abhängige Gentranskription ausüben. Es ist daher davon auszugehen, dass die hemmende Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität von CREB nicht durch eine Wirkung auf die Transaktivierungsdomäne von CREB vollzogen wird. Daraus lässt sich der Verdacht auf eine Beeinflussung der bZIP-Domäne von CREB durch die DLK ableiten. Der Koaktivator von CREB, TORC, welcher mittels seiner N-terminalen coiled-coil-Domäne mit der bZIP-Domäne von CREB interagiert und somit die transkriptionelle Aktivität von CREB verstärkt, könnte eine wichtige Rolle in der Vermittlung der DLK-Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von CREB einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die DLK in der Lage ist, mit TORC über seine N-terminale coiled-coil-Domäne zu interagieren (Daten meiner Arbeitsgruppe, unveröffentlicht). Denkbar wäre dabei eine TORC-inhibierende Wirkung der DLK, was zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivität von CREB, vermittelt über seine bZIP-Domäne, führen könnte.

Die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription durch die DLK könnte daher sowohl durch ihre direkte Interaktion mit CREB bzw. durch negative Beeinflussung der CREB-Koaktivatoren CBP oder TORC zustande kommen. CREB könnte dabei die Rolle einer Rekrutierungsplattform für die beteiligten Proteine einnehmen und somit die Interaktion der DLK mit den Zielproteinen ermöglichen.

Gemeinsam ist diesen Hypothesen einer nukleär lokalisierten DLK, dass sie in eine reduzierte Aktivität des Beta-Zell-protectiven Transkriptionsfaktors CREB münden. Schlussendlich könnten diese Mechanismen dazu beitragen, den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Anstieg der Apoptoserate in den Beta-Zellen, bedingt durch eine nukleäre DLK-Lokalisation, zu erklären.

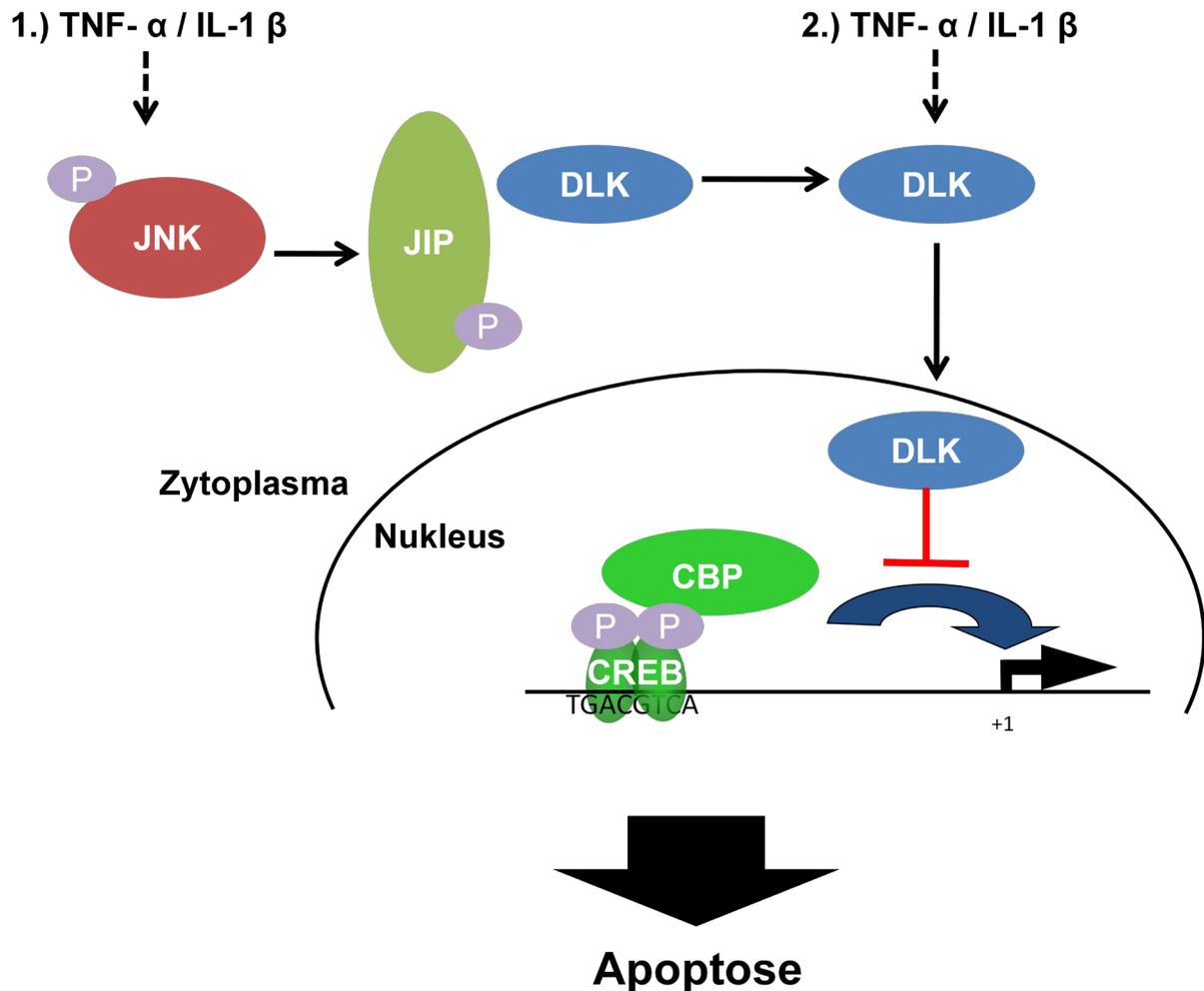


Abb. 4.2.: Zusammenfassung der skizzierten Mechanismen zur Translokation der DLK und deren Auswirkung auf die Beta-Zellfunktion und -apoptose. Die DLK ist unter basalen Bedingungen vorwiegend im Zytosol lokalisiert. 1.) Die Zytokine TNF- α und IL-1 β führen über die Aktivierung von JNK zu einer Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein JIP in das Zytosol. Die freigesetzte DLK ist anschließend in der Lage, mit Hilfe ihrer Kernerkennungssequenz die Kernmembran zu überwinden und in den Kern zu gelangen. 2.) Ein weiterer denkbarer Mechanismus, der zu einer Akkumulation der DLK im Nucleus der Zelle führt, ist vermutlich durch eine direkte Aktivierung der Kernerkennungssequenz der DLK durch die Zytokine gekennzeichnet (vgl. S.108). Innerhalb des Kerns hemmt die DLK die Beta-Zell-protective CRE-/CREB- und CBP-abhängige Gentranskription und fördert dadurch die Apoptoserate der Beta-Zellen.

Die zentrale Rolle von JNK in der Signaltransduktion von proinflammatorischen Zytokinen konnte durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden (Larsen et al. 1998; Welsh 1996; Donath et al. 2003; Shoelson et al. 2006; Lee & Goldfine 2006; Hotamisigilil 2006; Bonny et al. 2001). Der aus dieser Signalkaskade resultierende Effekt könnte in einer Steigerung der Apoptoserate von Beta-Zellen münden. JNK scheint daher eine wichtige Position in der Pathogenese des Diabetes Typ II zu besitzen. Ebenfalls ist eine Beteiligung der DLK an der Aktivierung von JNK beschrieben worden (Nihalani et al. 2001, 2003). Eine wichtige Funktion der DLK in diesem Signalweg hin zur Apoptoseinduktion erscheint daher möglich. Merritt et al. (1999) konnten in einer Studie in Nervenzellen zeigen, dass die nachgeschaltete MAP2-Kinase MKK7 ebenfalls im Zellkern vorhanden ist. Auch von JNK ist bekannt, dass diese MAP-Kinase im Nukleus von Zellen vorkommen kann (Chang L & Karin 2001; Yang et al. 1997). Die Hemmung der CRE-/CREB- und CBP-abhängigen Gentranskription durch die nukleär lokalisierte DLK könnte daher auch über Aktivierung von nukleär lokalisierten, nachgeschalteten Kinasen wie MKK7 oder JNK vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAP3-Kinase DLK eine funktionelle Kernerkenungssequenz besitzt. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Kernerkenungssequenz zu einer Hemmung der Translokation in den Kern sowie zu einer verminderten Hemmung der CRE-/CREB- und CBP-abhängigen Gentranskription führt. Die essentielle Rolle von CREB für die Insulingentranskription sowie für das Überleben der Beta-Zelle lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Hemmung der DLK-Translokation die betazelltoxische Wirkung der DLK vermindern und dadurch der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II entgegenwirken könnte.

4.5 Auswirkungen einer DLK-Hemmung

Die Daten über die Beeinflussung der Gentranskription und der Induktion der Apoptose durch die DLK geben Hinweise darauf, dass nukleär lokalisierte DLK eine potentielle Rolle in der Regulation von Beta-Zellfunktionen besitzen könnte. Die DLK könnte möglicherweise durch Protein-Interaktionen im Kern in die Regulation von Beta-Zellfunktionen und Beta-Zell-Apoptose involviert sein. Die negative Beeinflussung der Beta-Zellfunktion durch die DLK könnte in einer Abnahme der Beta-Zellmasse und somit in einer Progression des Diabetes Typ II münden.

Seit erfolgreicher klinischer Einführung des ersten Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib ist die Ära der zielgerichteten Arzneimitteltherapie (Targeted Therapy) eingeläutet. Verschiedene Proteinkinasen stellen bei dieser Art der Medikation ein immer interessanter werdendes Ziel

der Pharmakotherapie dar. Die spezifische Inhibition einer in die Pathogenese einer Erkrankung involvierten Proteinkinase könnte eine nebenwirkungsarme Therapie ermöglichen. Eine derartige Therapie soll optimaler Weise in pathologisch aktivierte Stoffwechselwege eingreifen und dabei normale zelluläre Abläufe nicht beeinflussen. Zurzeit werden immer mehr Kinaseinhibitoren verfügbar, darunter auch verschiedene, die in die MAP-Signalkaskade eingreifen.

Die Funktion der DLK in unterschiedlichen Zelltypen ist jedoch noch nicht hinreichend erforscht. Da die DLK in die Regulation der Apoptose involviert ist, könnte eine generelle Hemmung der DLK in einem Organismus zu einer Reduktion der Apoptoserate führen und somit das Auftreten von Tumoren begünstigen. Desweiteren gibt es Hinweise, dass die DLK an physiologischen Aufgaben innerhalb von Nervenzellen beteiligt ist (Hirai et al. 2006; Eto et al. 2009) Es wird daher wichtig sein, die Verteilung sowie die Funktion der DLK in anderen Geweben zu erforschen. Eine Beta-zellspezifische Hemmung der DLK könnte eine im prädiabetischen Zustand pathologisch aktive DLK inhibieren und dadurch den Verlust an funktioneller Beta-Zellmasse verhindern. Dabei stellt die DLK als MAP3-Kinase ein besonders attraktives Ziel zur Inhibition des MAP-Signalwegs dar, ohne dass dabei nachgeschaltete Kinasen, welche in andere MAP-Signalkaskaden involviert sind, beeinflusst werden. Ein Fortschreiten des Diabetes mellitus Typ II zu einer irreversiblen Erkrankung mit Verlust an Beta-Zellen und klinischen Symptomen könnte durch eine Hemmung der DLK verlangsamt werden. Eine derartige Inhibition könnte durch eine negative Regulierung der Kernerkenungssequenz der DLK erreicht werden. Die NLS-Sequenz der DLK stellt hierbei ein potentiell Ziel zur Verhinderung der Zytokin-induzierten Apoptoseinduktion in Beta-Zellen dar. Dabei könnte die Inhibition der Kernerkenungssequenz durch Interferieren kleiner Moleküle (small molecules) an dieser Sequenz zu einer Minimierung der nukleären DLK-Lokalisation beitragen und somit den Beta-Zell destruktiven Effekt von Zytokinen, welcher über die DLK durch Hemmung des Transkriptionsfaktors CREB sowie der Apoptoseinduktion vermittelt werden könnte, vermindern. Dies könnte einen interessanten Angriffspunkt einer gezielten Pharmakotherapie gegen die Progression des Diabetes mellitus Typ II darstellen.

5. Zusammenfassung

Es existieren viele Hinweise darauf, dass proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1 β an dem Verlust der funktionellen Beta-Zellmasse im prädiabetischen Zustand beteiligt sind. Sie führen dabei zur Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs unter Einbeziehung von JNK, was zu einer gesteigerten Apoptoserate von Beta-Zellen führt. Die als JNK-Aktivator beschriebene DLK ist sowohl in die Induktion von Apoptose in Neuronen und Beta-Zellen als auch in die Hemmung von CREB involviert. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Frage nach der subzellulären Lokalisation der DLK geklärt werden. Zum anderen sollte die Auswirkung der DLK auf das Beta-Zellüberleben abhängig von ihrer subzellulären Verteilung untersucht werden. Es konnte unter Zuhilfenahme einer insulinproduzierenden Beta-Zelllinie gezeigt werden, dass die unter basalen Bedingungen größtenteils im Zytoplasma und membranär lokalisierte DLK durch den Einfluss der Zytokine TNF- α und IL-1 β verstärkt im Kern lokalisiert war. Die erhobenen Daten wurden durch den Einsatz von Immunfluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie sowie der Zellfraktionierung ermittelt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine JNK-Aktivierung zur Kernakkumulation der DLK beitrug. Dieser Befund ließ sich durch eine JNK-induzierte Dissoziation der DLK von ihrem Adapterprotein JIP erklären. Es konnte eine funktionelle zweiteilige Kernerkenntnissequenz innerhalb der DLK identifiziert werden, die notwendig für einen suffizienten Kerntransport der DLK war. In der vorliegenden Arbeit wurden zur besseren Charakterisierung zwei Mutanten hergestellt, die Mutationen innerhalb der basischen NLS-Sequenz trugen. Für beide DLK-NLS-Mutanten konnte eine katalytische Aktivität, im Sinne einer Phosphorylierung von JNK, nachgewiesen werden. Durch Mutation der Kernerkenntnissequenz verminderte sich sowohl die Zytokin-induzierte Translokation der DLK in den Kern als auch ihre hemmende Wirkung auf die Beta-Zell-protective CRE-/CREB- und CBP-abhängige Gentranskription. Diese Befunde sind vor dem Hintergrund, dass CREB eine entscheidende Rolle für die Funktion und Aufrechterhaltung der Beta-Zellmasse spielt, von besonderem Interesse. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich der Apoptose-induzierende Effekt der DLK in Beta-Zellen durch Mutation der Kernerkenntnissequenz vermindert. Es ist daher davon auszugehen, dass die negativen Effekte der DLK auf die Beta-Zelle sowie ihre Apoptose-induzierende Wirkung zumindest in Teilen durch beeinflussende Mechanismen der DLK im Kern hervorgerufen werden. Eine Hemmung der DLK-Translokation in den Kern könnte daher einen effektiven Mechanismus darstellen, um die Beta-Zelle vor dem schädlichen Einfluss der DLK zu schützen und somit das Fortschreiten des Diabetes mellitus Typ II zu verhindern.

6. Anhang

Teile der Arbeit wurden auf folgenden Kongressen im Rahmen von Vorträgen und gedruckten Abstracts veröffentlicht:

50. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz 10. – 12.03.2009

Translocation of the mitogen-activated triple kinase DLK to the nucleus

Manuel Wallbach¹, Jenny Kruegel², Nicolai Miosge², Elke Oetjen¹

¹Abteilung Pharmakologie und ²AG Orale Biologie und Geweberegeneration, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

9. Insel-Workshop, Greifswald 27.03 – 29.03.2009

TNF- α induced translocation of the mitogen-activated triple kinase DLK

Manuel Wallbach¹, Jenny Kruegel², Nicolai Miosge², Elke Oetjen¹

¹Abteilung Pharmakologie und ²AG Orale Biologie und Geweberegeneration, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

44. Jahrestagung der Deutschen Diabetes- Gesellschaft

Leipzig 20. – 23. 5.2009

TNF- α -induzierte Translokation der beta-zellschädigenden Kinase DLK in den Zellkern

Elke Oetjen¹, Jenny Kruegel², Nicolai Miosge², Manuel Wallbach¹

¹Abteilung Pharmakologie und ²AG Orale Biologie und Geweberegeneration, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

7. Literaturverzeichnis

Abdelli S, Abderrahmani A, Hering BJ, Beckmann JS, Bonny C (2007): The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolation stress-induced rat pancreatic islet apoptosis. *Diabetologia* 50, 1660-1669

Abrams B, Grill B, Huang X, Jin Y (2008): Cellular and Molecular Determinants Targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR Protein RPM-1 to Perisynaptic Regions. *Dev Dyn* 237, 630-639

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171

Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbeak Madsen O, Mandrup-Poulsen T, Bonny C (2000): The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic β -cells. *Diabetes* 49, 1468-1476

Andersen NA, Larsen CM, Mandrup-Poulsen T (2000): TNF- α and IFN γ potentiate IL-1 β induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islet of Langerhans. *Diabetologia* 43, 1389-1396

Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA (1981): Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 87-93

Barton K, Muthusamy N, Changyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM (1996): Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature* 379, 81-85

Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR (1997): Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction *Genes Dev.* 11, 824-834

Bergeron P, Douziech M, Daigle N, Blouin R (1997): Inhibition of cell growth by overexpression of the ZPK gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 153-155

Bonner WM (1975): Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *J Cell Biol* 64, 421-430

Bonny C, Oberson A, Steinmann M, Schorderet DF, Nicod P, Waeber G (2000): IBI reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 275, 16466-16472

Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauer C, Schorderet DF (2001): Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50, 70-82

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-252

Butler AE, Janson J, Boner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003): Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type-2 diabetes mellitus. *Diabetes* 52, 102-110

Campbell IL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC (1989): Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic β -cell. *J Immunol* 143, 1188-1191

Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Bell E, Campbell D, Zhu Y, Young R, Trucco M, Markmann JF, Naji A, Wolf BA (2003): Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting beta-cells. *Diabetes* 52, 2296-2303

Chang I, Kim S, Kim JY, Cho N, Kim YH, Kim HS, Lee MK, Kim KW, Lee MS (2003): Nuclear factor kappaB protects pancreatic beta-cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *Diabetes* 52, 1169-1175

Chang L, Karin M (2001): Mammalian MAP kinases signaling cascades. *Nature* 410, 37-40

Chen X, Rzhetskaya M, Kareva T, Bland R, During MJ, Tank AW, Kholodilov N, Burke RE (2008): Antiapoptotic and trophic effects of dominant-negative forms of dual leucine zipper kinase in dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurosci* 28, 672-680

Chuderland D, Konson A, Seger R (2008): Identification and Characterization of a General Nuclear Translocation Signal in Signaling Proteins. *Mol Cell* 31, 850-861

Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL (2005): Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54, 97-107

Collins CA, Wairkar YP, Johnson SL, DiAntonio A (2006): Highwire Restrains Synaptic Growth by Attenuating a MAP Kinase Signal. *Neuron* 51, 57-69

Dabelea D, Pettitt DJ, Jones KL, Arslanian SA (1999): Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents. An emerging problem. *Endocrinol Metab Clin North* 28, 709-729

Dagert M, Ehrlich SD (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escheria coli* cells. *Gene* 6, 23-28

Daviau A, Proulx R, Robitaille K, Di Fruscio M, Tanguay RM, Landry J, Patterson C, Durocher Y, Blouin R (2006): Down-regulation of the mixed-lineage dual leucine zipper-bearing kinase by heat shock protein 70 and its co-chaperone CHIP. *J Biol Chem* 281, 31467-31477

Daneman D (2006): Type 1 diabetes. *The Lancet* 367, 847-858

De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. (1987): Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-737

Dingwall C, Laskey RA (1991): Nuclear targeting sequences – a consensus? *Trends Biochem Sci* 16, 478-481

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005

Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, Steffen Hermann T, Ihlemann N, Baunbjerg Nielsen D, Spohr C, Kober L, Vaag A, Torp-Pedersen C (2005): Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res* 42, 517-525

Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999): Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islet of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738-744

Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T (2003): Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81, 455-470

Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reincke M (2005): Mechanisms of β -cell Death in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 54, 108-113

Donath MY, Størling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T (2008): Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev* 29, 334-350

Douziech M; Laberge G, Grondin G, Daigle N, Blouin R (1999): Localization of the Mixed-lineage Kinase DLK/MUK/ZPK to the Golgi Apparatus in NIH 3T3 Cells. *J Histochem Cytochem* 47, 1287-1296

Ebstein W (1876): Zur Therapie des Diabetes Mellitus, insbesondere über die Anwendung des Salicylsäuren Natron bei demselben. *Berlin Klin Wochenschr.* 24, 337-340

Eisenbarth GS (1986): Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314, 1360-1368

Elbein SC (2002): Perspective: the search for genes for type 2 diabetes in the post-genome era. *Endocrinology* 143, 2012-2018

Eliseev RA, VanWinkle B, Rosier RN, Gunter TE (2004): Diazoxide-mediated preconditioning against apoptosis involves activation of cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF κ B. *J Biol Chem* 279, 46748-46754

Eto K, Kawauchi T, Osawa M, Tabata H, Nakajima K (2009): Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. *Neurosci Res.* 66, 37-45

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003): Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8

Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A (2002): The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 30, 235-238

Fan G, Merritt SE, Kortjenann M, Shaw PE, Holzman LB (1996): Dual leucine zipper bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* 271, 24788-24793

Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL (1997): MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J* 16, 4961-4972

Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F (2001): High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islet of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50, 1290-1301

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 7413-7417

Frings S, Baumann A (2000): Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.
<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/epifluol.jpg>, Abrufdatum: 29.01.2010

Gallo KA, Johnson GJ (2002): Mixed-lineage Kinase control of JNK and p38 MAPK Pathways. *Mol Cell Biol* 3, 663-672

Germain L, Fradette J, Robitaille H, Guinard R, Grondin G, Nadeau A, Blouin R (2000): The mixed lineage kinase leucine-zipper protein kinase exhibits a differentiation-associated localization in normal human skin and induces keratinocyte differentiation upon overexpression. *J Invest Dermatol* 115, 860-867

Gonzalez-Gay MA, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Martin J, Llorca J (2006): Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Exp Rheumatol* 24, 83-86

Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM, Bastiani M. (2009): Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science*, 323, 802-806

Hébert SS, Daviau A, Grondin G, Latreille M, Aubin RA, Blouin R (2000): The Mixed Lineage kinase DLK Is Oligomerized by Tissue Transglutaminase during Apoptosis. *J Biol Chem* 275, 32482-32490

Heit JJ (2007): Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays* 29, 1011-1021

Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776

Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Auflage 2007, Gerd Herold Verlag, Köln 2007

Hirai S, Izawa M, Osada S, Spryrou G, Ohno S (1996): Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12, 641-650

Hirai S, Kawaguchi A, Hirasawa R, Baba M, Ohnishi T, Ohno S (2002): MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. *Development* 129, 4483-4495

Hirai S, Kawaguchi A, Suenaga J, Ono M, Cui DF, Ohno S (2005): Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. *Gene Exp Patterns* 5, 517-523

Hirai S, Cui de F, Miyata T, Ogawa M, Kiyonari H, Suda Y, Aizawa S, Banba Y, Ohno S (2006): The c Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 26, 11992-12002

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002): A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336

Holzman LB, Merritt SE, Fan G (1994): Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 169, 30808-30817

Hotamisligil GS (2005): Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 52, 73-78

Hotamisligil GS (2006): Inflammation and metabolic disorder. *Nature* 444, 860-867

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91

Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuče BA, de Castro E, Lachaize C, Langendijk-Genevaux PS, Sigrist CJ (2008): The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* 36, 245-249

Inagaki N, Ito M, Nakano T, Inagaki M (1994): Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends Biochem Sci.* 19, 448-452

International Diabetes Federation (2009): IDF Diabetes Atlas 2009 4th edition. <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance>, Abrufdatum: 29.01.2010

Invitrogen GmbH: pcDNA3. <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pcdna3.pdf>, Abrufdatum: 29.01.10

Ishizuka N, Yagui K, Tokuyama Y, Yamada K, Suzuki Y, Miyazaki J, Hashimoto N, Makino H, Saito Y, Kanatsuka A (1999): Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic β -cells. *Metabolism* 48, 1485-1492

Jambal P, Masterson S, Nesterova A, Bouchard R, Bergman B, Hutton JC, Boxer LM, Rusch JEB, Pugazhenti S (2003): Cytokine-mediated down-regulation of the transcription factor cAMP-response element-binding protein in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 278, 23055-23065

Jans DA, Xiao CY, Lam MH (2000): Nuclear targeting signal recognition: A key control point in nuclear transport? *BioEssays* 22, 532-544

Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M (2003): cAmp promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17, 1575-1580

Kahn SE (2003): The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3-19

Kahn SE, Hull R, Utzschneider KM (2006): Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846

Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE (1984a): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984b): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509

Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M (2004): Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 10, 1128-1132

Keahey HH, Rajan AS, Boyd AE 3rd, Kunze DL (1989): Characterization of voltage-dependent Ca²⁺ channels in beta-cell line. *Diabetes* 38, 188-193

Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bähr M (2004): Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis* 1, 9-19

Kerner W, Brückel J, Böhm BO (2004): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Oktober 2004. Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.): Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf, Abrufdatum: 22.07.2009

Kiortsis DN, Mavridis AK, Vasakos S, Nikas SN, Drosos AA (2005): Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 64, 765-766

Kutschenko A: Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Calcineurin-Phosphatase, Dual-Leucine-Zipper-Bearing-Kinase (DLK), Insulingentranskription und Vitalität einer pankreatischen beta-Zelllinie. Med. Diss. Göttingen 2008

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH (1994): Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lanford RE, Kanda P, Kennedy RC (1986): Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 46, 575-582

- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH (2007):** Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interactin with Importin α . *J Biol Chem* 282, 5101-5105
- Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlens AE, Su MS, Seedorf K, Shapiro L, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T (1998):** Interleukin-1 β -induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271, 15294-15300
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007):** Interleukin-1-receptor-antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517-1526
- Laybutt DR, Kaneto H, Hansenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC (2002):** Increased expression of antioxidant and anti-apoptotic genes in islet that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51, 413-423
- Lewcock JW, Genoud N, Lettieri K, Pfaff SL (2007):** The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* 56, 604-620
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997):** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489
- Liu G, Rondinone CM (2005):** JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 6, 979-987
- Maedler K, Donath MY (2004):** Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res* 62, 67-73
- Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY (2001a):** Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69-76
- Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY (2001b):** Glucose-induced apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets. *Diabetes* 50, 1683-1690
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY (2002):** Glucose-induced beta-cell production of interleukin-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islet. *J Clin Invest* 110, 851-860
- Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003):** Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52, 726-733
- Maedler K, Sergeev P, Ehses JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY (2004):** Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 β in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8138-8143

Maedler K, Schumann DM, Sauter N, Ellingsgaard H, Bosco D, Baertschiger R, Iwakura Y, Oberholzer J, Wollheim CB, Gauthier BR, Donath MY (2006): Low concentration of interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55, 2713-2722

Mandrup-Poulsen (1996): The role of interleukin-1 beta in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39, 1005-1029

Mata M, Merritt SE, Fan G, Yu GG, Holzman LB (1996): Characterization of dual leucine zipper bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J Biol Chem* 271, 16888-16896

Mayr B, Montminy M (2001): Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev/Mol Cell Biol* 2, 599-609

McGarry JD, Dobbins RL (1999): Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42, 128-138

McLean N, Ogilvie RF (1955): Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 4, 367-376

Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L (1993): Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase RAN/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* 123, 1649-1659

Merritt SE, Mata M, Nihalani D, Zhu C, Hu X, Holzman LB (1999): The mixed lineage kinase DLK utilizes Mkk7 and not MKK4 as substrate. *J Biol Chem* 274, 10195-10202

Migheli A, Attanasio A, Schiffer D (1992): LR Gold embedding of nervous tissue for immunoelectron microscopy studies. *Histochemistry* 97, 413-419

Miller BR, Press C, Daniels RW, Sasaki Y, Milbrandt J, DiAntonio A (2009): A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat Neurosci.* 12, 387-389

Mochly-Rosen D (1995): Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signaling transduction. *Science* 268, 247-251

Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD, Jin Y (2005): Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* 120, 407-420

National Heart Lung and Blood Institute (1998): Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. The evidence report. *Obes Res* 6, 51-209

Newmeyer DD, Forbes DJ (1988): Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* 52, 641-653

- Nihalani D, Merritt S, Holzman LB (2000):** Identification of structural and functional domains in mixed lineage kinase dual leucine zipper-bearing kinase required for complex formation and stress-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 275, 7273-7279
- Nihalani D, Meyer D, Pajni S, Holzman LB (2001):** Mixed-lineage kinase dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. *EMBO J* 20, 3447-3458
- Nihalani D, Wong HN, Holzman LB (2003):** Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulated JNK module dynamics and activation. *J Biol Chem* 278, 28694-28702
- Nihalani D, Wong H, Verma R, Holzman LB (2007):** Scr family kinases directly regulate JIP1 module dynamics and activation. *Mol Cell Biol* 27, 2431-2441
- Oetjen E, Diedrich T, Eggers A, Eckert B, Knepel W (1994):** Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin gene. *J Biol Chem* 269, 27036-27044
- Oetjen E, Baun, D, Beimesche S, Krause D, Cierny I, Blume R, Dickel C, Wehner S, Knepel W (2003a):** Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporine A and tacrolimus in primary, mature islet of transgenic mice. *Mol Pharmacol* 63, 1289-1295
- Oetjen E, Grapentin D, Blume R, Seeger M, Krause D, Eggers A, Knepel W (2003b):** Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367, 227-236
- Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P, Knepel W (2005):** The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *Br J Pharmacol* 144, 982-993
- Oetjen E, Lechleiter A, Blume R, Nihalani D, Holzman L, Knepel W (2006):** Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. *Diabetologia* 49, 332-342
- Oetjen E, Blume R, Cerny I, Schlag C, Kutschenko A, Krätzner R, Stein R, Knepel W (2007):** Inhibition of MafA and insulin gene transcription by interleukin-1 β and MEKK1 in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia* 50, 1678-1687
- Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000):** Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6, 539-550
- Paine PL, Moore LC, Horowitz SB (1975):** Nuclear envelope permeability. *Nature* 254, 109-114

Parkash J, Chaudry MA, Rhoten WB (2005): Tumor necrosis factor- α -induced changes in insulin producing β -cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 286, 982-993

Pickup JC, Crook MA (1998): Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41, 1241-1248

Pietro Paolo M, Barinas-Mitchell E, Pietro Paolo SL, Kuller LH, Trucco M (2000): Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 32-38

Pingoud A, Urbanke C: Arbeitsmethoden der Biochemie. 1. Auflage: de Gruyter, Berlin 1997

Plaumann S, Blume R, Borchers S, Steinfeld HJ, Knepel W, Oetjen E (2008): Activation of the dual leucine-zipper-bearing kinase and induction of β -cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporine A. *Mol Pharmacol* 73, 652-659

Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, Krogh-Madsen R, Erikstrup C, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Pedersen BK (2007): Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50, 2562-71

Quimby BB, Dasso M (2003): The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 338-344

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL (1998): Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55, 1139-1149

Raff M (1998): Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119-122

Ramsby ML, Makowski GS, Khairallah EA (1994): Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis* 15, 265-277

Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD (1988): Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 46, 3-10

Reddy UR, Pleasure D (1994): Cloning of a novel putative protein kinase heaving a leucine zipper domain from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 612-620

Reddy UR, Basu A, Bannermann P, Ikegaki N, Reddy CD, Pleasure D (1999): ZPK inhibits PKA induced transcriptional activation by CREB and blocks retinoic acid induced neuronal differentiation. *Oncogene* 18, 4474-4484

Reed JC (2000): Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157, 1415-1430

Reid BG, Flynn GC (1997): Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36, 6786-8791

Rhodes CJ (2005): Type 2 diabetes – a matter of β -cell life and death? *Science* 307, 380-384

Richardson WD, Mills AD, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1988): Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell* 52, 655-664

Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequences: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623

Robitaille H, Proulx R, Robitaille K, Blouin R, Germain L (2005): The mitogen-activated protein kinase kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 280, 12732-12741

Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE (1999): Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 22, 345-354

Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G (1998): Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4481-4486

Sadowski I, Ptashne M (1989): A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17, 7539

Sakumo H, Ikeda A, Oka S, Kozutsumi Y, Zanetta JP, Kawasaki T (1997): Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *J Biol Chem* 272, 28622-28629

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. Auflage: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467

Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP (1981): Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4339-43343

Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419

Schumann R: Epiretinale Membranen Die Ultrastruktur nach Anwendung von Kryomethoden und chemischer Fixierung. Med. Diss. München 2004

Schwanger M, Blume R, Oetjen E, Knepel W (1993a): Inhibition of cAMP-responsive element-mediated gene transcription by cyclosporine A and FK506 after membrane depolarization. *J Biol Chem* 268, 23111-23115

Schwaninger M, Lux G, Blume R, Oetjen E, Hidaka H, Knepel W (1993b): Membrane depolarisation and calcium influx induce glucagon gene transcription in pancreatic islet cells through the cyclic AMP-responsive element. *J Biol Chem* 268, 5168-5177

Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M (2004): The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119, 61-74

See RH, Calvo D, Shi Y, Kawa H, Po-Shan Luke M, Yuan Z, Shi Y (2001): Stimulation of p300-mediated Transcription by the Kinase MEKK1. *J Biol Chem* 276, 16310-16317

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006): Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 16, 1793-1801

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007): Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180

Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003): Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52, 812-817

Sun P, Enslin H, Myung PS, Maurer RA (1994): Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8, 2527-2539

Taniguchi E, Toyoshima-Morimoto F, Nishida E (2002): Nuclear Translocation of Plk1 by Its Bipartite Nuclear Localization Signal. *J Biol Chem* 277, 48884-48888

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2002): Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 25, 5-20

Tran EJ, Wentz SR (2006): Dynamics nuclear pore complex: life on the edge. *Cell* 125, 1041-1053

Treisman R (1996): Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8, 205-215

Ventura JJ, Kennedy NJ, Lamb JA, Flavell RA, Davis RJ (2003): c-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. *MolCell Biol* 23, 2871-2882

Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widman C, Maillard A, Miklossy J, Dina C, Hani E, Vionnet N, Nicod P, Boutin P, Froguel P (2000): The gene encoding MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Gen* 24, 291-195

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005): Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119

Welsh N (1996): Interleukin-1 beta-induced ceramide and diacylglycerol generation may lead to activation of the c-Jun NH2-terminal kinase and the transcription factor ATF2 in the insulin-producing cell line RINm5F. *J Biol Chem* 271, 8307-8312

Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL (2005): Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* 54, 3238-3244

Werner ED, Lee J, Hansen L, Yuan M, Shoelson SE (2004): Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem* 279, 35298-35305

Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE (1999): The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104, 787-794

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004): Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* 27, 1047-1053

Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ (2002): Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic β -cells (INS-1). *J Biol Chem* 277, 49676-49684

Xu Z, Maroney AC, Dobrzanski P, Kukekov NV, Greene LA (2001): The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 4713-4724

Xu Z, Kukekov NV, Greene LA (2005): Regulation of apoptotic c-Jun N-terminal kinase signaling by a stabilization-based feed-forward loop. *Mol Cell Biol* 25, 9949-9959

Yang J, Robert CE, Burkhardt BR, Young RA, Wu J, Gao Z, Wolf BA (2005): Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 3217-3228

Zhou XY, Shibusawa N, Naik K, Porras D, Temple K, Ou H, Kaihara K, Roe MW, Brady MJ, Wondisford FE (2004): Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat Med* 10, 633-637

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Betreuerin Frau PD Dr. med. Elke Oetjen für die Vergabe dieses spannenden und faszinierenden Themas sowie für die zahlreichen wertvollen Anregungen, lehrreichen Diskussionen und die gute Betreuung während der gesamten Zeit in der Abteilung. Ebenfalls möchte ich mich für die ausgezeichnete Beratung bei der Ausarbeitung von Vorträgen, Abbildungen und der Verfassung dieser Arbeit bei ihr bedanken.

Prof. Dr. med. Nicolai Miosge und Jenny Krügel (AG Orale Biologie und Geweberegeneration, Abteilung Prothetik Universität Göttingen) danke ich für die hervorragende Einführung in die Elektronenmikroskopie sowie für die Bereitstellung von Laborräumen und Materialien.

Für die Benutzung des Elektronenmikroskops danke ich der Abteilung Neuropathologie um Prof. Dr. med. Brück. Ebenso gilt mein Dank Frau Maruschak (Abteilung Neuropathologie) für die wertvolle Hilfe beim Umgang mit dem Elektronenmikroskop.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie ist die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu verdanken.

Ich danke meinen Eltern Ottmar und Hannelore Wallbach für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit. Sie haben meine Pläne und Ziele stets unterstützt und mir sowohl durch fachliche als auch ermutigende Gespräche viel Motivation gegeben. Ebenfalls danke ich meinen Großeltern für ihre Unterstützung.

Silke Greune danke ich ganz herzlich für die Unterstützung während der Zeit meiner Promotion sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 16. September 1983 wurde ich in Göttingen als einziger Sohn von Hannelore und Ottmar Wallbach geboren. Meine Mutter, geboren am 31.8.1958, arbeitet als Krankenschwester. Mein Vater, geboren am 25.1.1955, ist Lehrer für die Fächer Chemie und Politik.

Meine Schulzeit begann im August 1990 mit der Einschulung in die Wilhelm-Neuhaus-Schule in Bad Hersfeld. Nach der Grundschulzeit besuchte ich ab September 1994 die Konrad-Duden-Schule in Bad Hersfeld.

Ab September 2000 besuchte ich die Modellschule Obersberg, um dort die Oberstufe bis zum Abitur zu absolvieren. Als Leistungskurse wählte ich die Fächer Mathematik und Chemie. Im Juli 2003 legte ich meine Abiturprüfungen mit der Endnote 1,3 ab.

Für die Zivildienstzeit suchte ich mir eine Stelle im Klinikum in Bad Hersfeld und begann im August 2003 im Zentrallabor.

Nach dem absolvierten Zivildienst begann ich im Sommersemester 2004 das Studium der Chemie in Göttingen. Im folgenden Wintersemester 2004/2005 habe ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität aufgenommen. Das Physikum legte ich im Sommer 2006 mit der Note 1,0 ab. Im zweiten Studienabschnitt konnte ich durch eine Famulatur klinische Erfahrung im Hôpital Européen George-Pompidou in Paris sammeln. Die wertvollen Erfahrungen, die ich dort in der Notaufnahme machen konnte, begleiten meine weitere klinische Tätigkeit. Darüber hinaus beschäftigte ich mich ab Oktober 2008 intensiv mit der vorliegenden experimentellen Arbeit in der Abteilung Pharmakologie bei PD Dr. med. Oetjen und Prof. Dr. med. Steinfelder. Für meine spätere Tätigkeit strebe ich eine Stelle an der Universität an, bei der ich die Möglichkeit habe, aktiv die Forschung mitzugestalten. Während des Studiums habe ich das Seminar Biologie für Mediziner, den Präparationskurs der Anatomie sowie das Pharmakologietutorium betreut. Als besonderes Ereignis während der klinischen Phase meiner Ausbildung habe ich die Teilnahme am Benjamin-Franklin Contest an der Charité im Sommer 2009 erlebt. Die Vorbereitung unter der Leitung von Prof. Füzesi wurde von exzellenten Dozenten der Universitätsmedizin Göttingen begleitet und fand ihren Höhepunkt am Tag des Wettbewerbes am Campus Benjamin Franklin in Berlin. Für das Praktische Jahr habe ich ein Auslandstertial am Universitätsspital in Basel geplant. Mein Studium werde ich voraussichtlich im Herbst 2010 mit der 2. Ärztlichen Prüfung abschließen.