

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

**Hemmung des β -zellspezifischen Transkriptionsfaktors MafA
durch die Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK)**

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

vorgelegt von

Marie-Jeannette Stahnke, geb. Oehmen
aus Neuss

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Reichardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.1.1. Das Pankreas und die β -Zelle	1
1.1.2. Die Ätiologie und Komplikationen des Diabetes mellitus.....	2
1.1.3. Die Pathophysiologie des Diabetes mellitus	4
1.2. Insulinbiosynthese	6
1.2.1. Das humane Insulingen	6
1.2.2. Die glucoseinduzierte und β -zellspezifische Insulingentranskription.....	7
1.2.3. Der Transkriptionsfaktor MafA	8
1.3. Signaltransduktion	10
1.3.1. Der MAPK-Signalweg.....	10
1.3.2. Die Dual Leucine-Zipper Kinase.....	12
1.4. Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.1.1. Geräte.....	18
2.1.2. Verbrauchsmaterial.....	20
2.2. Biologische und chemische Materialien	22
2.2.1. Chemikalien	22
2.2.2. Enzyme	24

2.2.3.	Puffer und Stammlösungen.....	24
2.2.4.	Kits	26
2.2.5.	Antikörper	27
2.2.6.	Antibiotika	28
2.2.7.	Inhibitoren.....	28
2.2.8.	Nachweissysteme.....	28
2.2.9.	Größenmarker	29
2.2.10.	Medien und Seren	29
2.3.	Molekularbiologisches Material	30
2.3.1.	DNA.....	30
2.3.1.1.	Reporterplasmide	30
2.3.1.2.	Expressionsplasmide.....	31
2.3.1.3.	Leervektoren	34
2.3.1.4.	Oligonukleotide.....	34
2.3.2.	Bakterien	34
2.3.3.	Adenoviren	35
2.4.	Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	36
2.4.1.	Sterilisation.....	36
2.4.2.	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA	36
2.4.3.	Herstellung antibiotikahaltiger LB-Agarplatten	36
2.4.4.	Herstellung chemisch kompetenter E.coli	37
2.4.5.	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	37
2.4.6.	Elektroporation elektrokompenter AdEasier-Zellen	38
2.4.7.	Restriktionsenzymatische Spaltung von Nukleinsäuren	40

2.4.8.	Agarosegelelektrophorese	40
2.4.9.	Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen	41
2.4.10.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	42
2.4.11.	Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten	43
2.4.12.	Restriktionsenzymverdau der klonierten Plasmide	43
2.4.13.	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	45
2.4.14.	Ethanolpräzipitation.....	46
2.4.15.	Minipräparation von Plasmid-DNA	46
2.4.16.	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	48
2.4.17.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
2.4.18.	Sequenzierung von DNA.....	52
2.5.	Klonierung von pAd-DLK-Plasmiden	54
2.5.1.	Herstellung der Plasmide pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A	54
2.5.2.	Generierung der rekombinanten DLK wt- und DLK K185A-Adenovirus-Plasmide mithilfe von AdEasier-Zellen.....	56
2.6.	Methoden für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen	58
2.6.1.	Zelllinien	58
2.6.2.	Medien und Puffer	58
2.6.3.	Zellkultivierung.....	59
2.6.4.	Splitten der Zellen	60
2.6.5.	Mediumwechsel	61
2.6.6.	Langzeitverwahrung und Reaktivierung der Zellen	61
2.6.7.	Transfektion von Plasmid-DNA nach der METAFECTENE™-Methode	62

2.6.8.	Transfektion von Plasmid-DNA nach der Lipofectamine™-2000-Methode...	63
2.6.9.	Behandlung der Zellen nach der Transfektion	64
2.6.10.	Zellernte und Herstellung von Zellextrakten für Reporter-genassays	66
2.6.11.	Zellernte und Herstellung von Zellextrakten für Proteinanalytik	67
2.7.	Luciferaseassay und GFP-Nachweis	68
2.7.1.	Nachweis der Luciferase-Reporter-gen-Aktivität	68
2.7.2.	Quantitativer Nachweis der GFP-Reporter-gen-Aktivität	70
2.7.3.	Qualitativer Nachweis der GFP-Reporter-gen-Aktivität.....	70
2.8.	Proteinanalytische Methoden	71
2.8.1.	Proteingehaltsmessung.....	71
2.8.2.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	72
2.8.3.	Semi-Dry-Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot).....	74
2.8.4.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	76
2.8.5.	Wiederaufbereitung von Nitrozellulosemembranen.....	77
2.9.	Statistik und Auswertung	78
3.	Ergebnisse	79
3.1.	Wirkung von der DLK auf verschiedene Promotoren in Abhängigkeit von der DLK- Lokalisation	79
3.1.1.	Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität von MafA in der β -Zelllinie HIT	79
3.1.2.	Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulingens in der β -Zelllinie HIT.....	81
3.1.3.	Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Glucokinasepromotors in der β -Zelllinie HIT.	83

3.1.4.	Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Promotors in der β -Zelllinie HIT.....	85
3.2.	Wirkung von DLK auf phosphorylierungsdefiziente MafA-Mutanten.....	87
3.2.1.	Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die transkriptionelle Aktivität von MafA-Mutanten in der β -Zelllinie HIT.....	87
3.2.2.	Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Mutanten-abhängige Insulinentranskription in der Nicht- β -Zelllinie JEG.....	89
3.3.	Halbwertszeit von DLK und MafA in der β-Zelllinie HIT	91
3.4.	Wirkung von DLK auf die Proteinstabilität von MafA	93
3.4.1.	Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge	93
3.4.2.	Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge bei zusätzlicher Behandlung mit dem JNK-Inhibitor	95
3.4.3.	Wirkung von DLK und JNK-Inhibitor auf die Phosphorylierung von JNK	97
3.5.	Wirkung von Proteasominhibitoren auf die Proteinstabilität von DLK und MafA in der Nicht-β-Zelllinie JEG	99
3.6.	Herstellung von DLK wt- und DLK K185A-Adenoviren	101
3.6.1.	Übersicht	101
3.6.2.	Sequenzierung, Überexpression, Fluoreszenzkontrolle und Western Blot von pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A.....	102
4.	Diskussion	105
4.1.	HIT- und JEG-Zellen stellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Funktion der DLK dar.....	107
4.2.	Adenoviraler Gentransfer als Möglichkeit erweiterter <i>in-vitro</i>-Untersuchungen	108
4.3.	Die DLK führt zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors MafA	109
4.3.1.	Die DLK hemmt die MafA-abhängige Insulinentranskription - in Abhängigkeit von ihrer subzellulären Lokalisation	109

4.3.2.	Die DLK hemmt die MafA-abhängige Insulinentranskription in Abhängigkeit der MafA-Phosphorylierung.....	111
4.3.3.	Die DLK vermindert die Proteinmenge von MafA unter Beteiligung von JNK.....	113
4.3.4.	Die DLK- und MafA-Proteinstabilität werden über die proteasomale Degradation reguliert.....	115
4.3.5.	Die DLK hemmt ein weiteres MafA-abhängiges Gen.....	119
4.4.	Die DLK-induzierte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Bcl-xL in β- Zellen ist abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation.....	121
4.5.	Schlussfolgerung.....	123
5.	Zusammenfassung.....	126
6.	Anhang: Vorträge und Poster zum Dissertationsthema.....	127
7.	Literaturverzeichnis.....	128

Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Ampère (Einheit für Stromstärke)</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
Ad	<i>Adenovirus/adenoviral</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
Apaf-1	<i>apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
AS	<i>Aminosäure(n)</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BS	<i>pBluescript (Leervektor)</i>
BSA	<i>bovine serum albumin, Rinderserumalbumin</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
c	<i>centi (1×10^{-2})</i>
c	<i>Konzentration</i>
ca.	<i>circa</i>
CaCl ₂	<i>Calciumchlorid</i>
CHIP	<i>c-term Hsp70 interacting protein</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMV	<i>Zytomegalievirus</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CsCl	<i>Cäsiumchlorid</i>
C-terminal	<i>Carboxy-Terminal</i>
DAP	<i>death associated protein</i>
DBD	<i>DNA-Bindungs-Domäne</i>
ddNTP	<i>Didesoxyribonukleosidtriphosphat</i>

DLK	<i>Dual Leucine-Zipper Kinase</i>
DLK-1	<i>DAP like kinase</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemolumineszenz</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EGTA	<i>Ethylenglycoltetraacetat</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii, und andere</i>
F	<i>Farad (Einheit für elektrische Kapazität)</i>
G	<i>Gauge (Einheit für den Außendurchmesser einer Kanüle)</i>
g	<i>Gramm</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GFP	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
GK	<i>Glucokinase</i>
GLUT-2	<i>Glucosetransporter Typ 2</i>
GSK-3	<i>Glycogen-Synthese-Kinase 3</i>
H	<i>human</i>
<i>h</i>	<i>plancksches Wirkungsquantum</i>
h	<i>Stunde(n)</i>
H ₂ O	<i>Wasser</i>
H ₂ O bidest.	<i>zweifach destilliertes Wasser</i>
HA	<i>Hämagglutinin</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCl	<i>Salzsäure</i>
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure</i>
HIT	<i>Hamster Insulinoma Tumorzelllinie</i>

Hiw	<i>Highwire</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
IB/JIP-1	<i>islet brain/JNK-interacting protein-1</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
inkl.	<i>inklusive</i>
Ins	<i>Insulin</i>
JDS	<i>Japan Diabetes Society</i>
JNK	<i>c-Jun-N-terminal Kinase</i>
Kap.	<i>Kapitel</i>
kb	<i>Kilobasenpaare</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
K ₂ HPO ₄	<i>di-Kaliumhydrogenphosphat</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
Kir	<i>K⁺ inward rectifiers, einwärtsgerichteter Kaliumstrom</i>
K _M	<i>Michaelis-Konstante, Maß für Enzymaffinität</i>
Konz	<i>Konzentration</i>
konz.	<i>Konzentriert</i>
LADA	<i>latent autoimmune diabetes of the adult</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Luc	<i>Luciferase</i>
LZK	<i>Leucine-Zipper Bearing Kinase</i>
μ	<i>mikro (1x10⁻⁶)</i>
m	<i>Meter</i>
m	<i>milli (1x10⁻³)</i>
M	<i>molar</i>
MafA	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierte Protein-Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase</i>
MARE	<i>Maf recognition element</i>
MEK	<i>MAP- und ERK-Kinase</i>

MG	<i>Molekulargewicht (in g/mol)</i>
MgCl ₂	<i>Magnesiumchlorid</i>
MgSO ₄	<i>Magnesiumsulfat</i>
min	<i>Minute(n)</i>
mind.	<i>mindestens</i>
MKK	<i>s. MAPKK</i>
MLK	<i>mixed lineage kinases</i>
MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MUK	<i>MAPK upstream kinase</i>
Mut	<i>Mutante</i>
ν	<i>Ny (Einheit für die Frequenz einer Welle)</i>
n	<i>nano (1x10⁻⁹)</i>
N	<i>Normalität (Einheit für Konzentration)</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaHCO ₃	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>di-Natriumhydrogenphosphat</i>
NaH ₂ PO ₄	<i>Natriumdihydrogenphosphat</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
NeuroD1	<i>neurogenic differentiation1</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal, Kernerkennungssequenz</i>
NODAT	<i>new-onset diabetes after transplantation</i>
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
N-terminal	<i>Amino-Terminal</i>
Ω	<i>Ohm (Einheit für elektrischen Widerstand)</i>
OD	<i>optische Dichte</i>
ori	<i>origin of replication, Replikationsursprung</i>
p	<i>pico (1x10⁻¹²)</i>
Pa	<i>Pascal (Einheit für Druck)</i>
pAVK	<i>peripher arterielle Verschlusskrankheit</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>

Pdx-1	<i>pancreatic and duodenal homeobox-1</i>
PEG	<i>Polyethylenglykol</i>
pH	<i>pH-Wert</i>
Phr1	<i>PAM, highwire and RPM-1</i>
POSH	<i>plenty of SH3</i>
RIPE3b1	<i>rat insulin promotor element 3b1</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RPM-1	<i>Regulator of Presynaptic Morphology</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
S	<i>Seite</i>
S	<i>Svedberg, 10^{-13} sek, (Einheit für den Sedimentationskoeffizienten)</i>
s.	<i>siehe</i>
s.o.	<i>siehe oben</i>
s.u.	<i>siehe unten</i>
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese</i>
sek	<i>Sekunde(n)</i>
SEM	<i>standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>SOB-Medium und Glucose</i>
sog.	<i>sogenannt</i>
Src	<i>Akronym aus cellular und sarcoma (Src-Kinase)</i>
SUR	<i>sulfonyl urea receptor, Sulfonylharnstoffrezeptor</i>
SV	<i>Simian Virus</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>Trisgepufferte Salzlösung</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin</i>
Tm	<i>Schmelztemperatur eines Primers</i>
TNF α	<i>Tumor-Nekrose-Faktor α</i>

Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
tRNA	<i>Transfer-RNA</i>
Tween 20	<i>Polyethylen-Sorbit-Monolaurat</i>
UpM	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
UV	<i>Ultraviolettes Licht</i>
V	<i>Volt (Einheit für Spannung)</i>
v/v	<i>Volumen pro Volumen</i>
Vol	<i>Volumina</i>
w/v	<i>Masse pro Volumen</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	<i>Wildtyp</i>
z. B.	<i>zum Beispiel</i>
ZPK	<i>Leucine-Zipper Protein Kinase</i>

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	<i>Alanin</i>	C	<i>Cystein</i>
D	<i>Aspartat</i>	E	<i>Glutamat</i>
F	<i>Phenylalanin</i>	G	<i>Glycin</i>
H	<i>Histidin</i>	I	<i>Isoleucin</i>
K	<i>Lysin</i>	L	<i>Leucin</i>
M	<i>Methionin</i>	N	<i>Asparagin</i>
P	<i>Prolin</i>	Q	<i>Glutamin</i>
R	<i>Arginin</i>	S	<i>Serin</i>
T	<i>Threonin</i>	V	<i>Valin</i>
W	<i>Tryptophan</i>	Y	<i>Tyrosin</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des humanen Insulingenpromotors.....	6
Abb. 1.2: Koordinierte und synergistische Aktivierung des Insulogens.....	7
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Maus-MafA.	8
Abb. 1.4: Signalkaskade der MAP-Kinasen.....	11
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK.....	12
Abb. 1.6: Rolle der DLK innerhalb der MAPK-Signalkaskade.	14
Abb. 1.7: Fragestellung: Was sind die zugrundeliegenden Mechanismen der hemmenden Wirkung der DLK auf den β -zellspezifischen Transkriptionsfaktor MafA?	17
Abb. 2.1: Größenmarker für Western Blot und Agarosegelelektrophorese.....	29
Abb. 2.2: G5E1B-Luc.....	30
Abb. 2.3: pGK-Luc.....	30
Abb. 2.4: -336hInsLuc.....	30
Abb. 2.5: Bcl-xL 1281.....	31
Abb. 2.6: Konzentrationsbestimmung von DNA.	36
Abb. 2.7: Kanamycin-Agarplatte nach Elektroporation mit AdEasier-Zellen.....	39
Abb. 2.8: Berechnung von Insert- und Vektormenge anhand der Größe ihrer Fragmente. ...	42
Abb. 2.9: Agarosegelelektrophorese der Klonierungsschritte von pAdTrack-CMV-DLK.	44
Abb. 2.10: Agarosegelelektrophorese nach der homologen Rekombination von pAd-DLK....	45
Abb. 2.11: PCR A: Ansatz. B: Einstellungen für den Thermo Cycler.....	52
Abb. 2.12: Sequenzierungs-PCR A: PCR-Ansatz. B: Einstellungen für den Thermo Cycler.	53
Abb. 2.13: Vektorkarten der Klonierung. A: Ausgangsvektor. B: Zielvektor.....	54
Abb. 2.14: Klonierter pAdTrack-CMV-DLK Vektor.....	55

Abb. 2.15: Homologe Rekombination zwischen pAdTrack-CMV-DLK und pAdEasy-1.	56
Abb. 2.16: Vektorkarten der homologen Rekombination. A: pAd-Easy-1. B: pAd-DLK.	56
Abb. 2.17: Oxidative Decarboxylierung von Luciferin.	69
Abb. 2.18: Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford.	71
Abb. 2.19: Aufbau einer Blotkammer.	75
Abb. 3.1: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von MafA in der β -Zelllinie HIT.	80
Abb. 3.2: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulingens in der β -Zelllinie HIT.	82
Abb. 3.3: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Glucokinasepromotors in der β -Zelllinie HIT.	84
Abb. 3.4: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Genpromotors in der β -Zelllinie HIT.	86
Abb. 3.5: Wirkung von DLK auf die transkriptionelle Aktivität von verschiedenen MafA-Mutanten in der β -Zelllinie HIT.	88
Abb. 3.6: Wirkung von DLK auf die MafA-Mutanten-abhängige Insulingentranskription in der Nicht- β -Zelllinie JEG.	90
Abb. 3.7: Zeitabhängige Wirkung von Cycloheximid auf die DLK- und MafA-Proteinmenge in der β -Zelllinie HIT.	92
Abb. 3.8: Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge.	94
Abb. 3.9: Wirkung von DLK auf die MafA-Proteinmenge bei zusätzlicher Behandlung mit dem JNK-Inhibitor.	96
Abb. 3.10: Wirkung von DLK und JNK-Inhibitor auf die Phosphorylierung von JNK.	98
Abb. 3.11: Wirkung von Lactacystin und Epoxomicin auf die DLK- und MafA-Proteinmenge.	100
Abb. 3.12: Sequenzierung von pAdTrack-CMV-DLK.	102

Abb. 3.13: Nukleotidabfolge AS 184-191 von DLK wt und DLK K185A nach der Sequenzierung. 102

Abb. 3.14: Fluoreszenz von pAdTrack-CMV-transfizierten HEK-293A-Zellen. 103

Abb. 3.15: Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK-wt- und pAdTrack-CMV-DLK-K185A-transfizierten HEK-293A-Zellen. 104

Abb. 4.1: Zusammenfassende Darstellung, wie die DLK in den Verlust der funktionellen β -Zellmasse involviert ist. 125

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

1.1.1. Das Pankreas und die β -Zelle

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) besteht aus zwei Organen: dem exokrinen und dem endokrinen Pankreas. Die Embryonalentwicklung geht vom Endoderm aus, wobei eine dorsale und ventrale Knospe entstehen, die sich zu einem Organ vereinigen (Slack 1995). Das exokrine Pankreas produziert und sezerniert Verdauungsenzyme in das Duodenum. Das endokrine Pankreas synthetisiert Hormone und sezerniert diese ins Blut. Den geringen Teil der Pankreasmasse (1 - 2 %) nimmt das endokrine Pankreas ein. Es besteht aus den Langerhans-Inseln, erstmalig entdeckt von Paul Langerhans im Jahre 1869. Die Langerhans-Inseln bestehen aus mehreren hormonproduzierenden Zelltypen: der überwiegende Teil der Zellen produziert das Peptidhormon Insulin (β -Zellen), des Weiteren werden Glukagon (α -Zellen), Somatostation (δ -Zellen), pankreatisches Polypeptid (PP-Zellen) und Ghrelin (ϵ -Zellen) synthetisiert.

Die wichtigsten Funktionen der pankreatischen β -Zellen sind die Insulinbiosynthese und die Insulinsekretion. Die β -Zellen sind Energiesensoren, die über metabolische, neuronale sowie hormonelle Signale und insbesondere die Glucosekonzentration im Blut Informationen über den Ernährungszustand des Körpers bekommen (Hersberger et al. 2009). Die Insulinsekretion der β -Zellen wird hauptsächlich über den Glucosespiegel reguliert. Bei einem über dem Nüchternblutzucker erhöhten Glucosespiegel wird Insulin dosisabhängig und biphasisch ausgeschüttet: Glucose wird über den Glucosetransporter Typ 2 (GLUT-2) in die Zelle aufgenommen und durch das als Glucosesensor agierende Enzym Glucokinase phosphoryliert (German 1993; Efrat et al. 1994; Macdonald et al. 2005; Kaneto et al. 2008). Nachfolgend findet in den β -Zellen die Glykolyse statt, an deren Ende Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird. Durch das ansteigende ATP/ADP-Verhältnis kommt es zu einem Verschluss ATP-abhängiger Kir6.2-Kaliumkanäle (K^+ *inward rectifiers*), was wiederum zu einer Membrandepolarisation führt (Hersberger et al. 2009). Folge der Membrandepolarisation ist die Öffnung

spannungsabhängiger Calciumkanäle: Calciumionen strömen aus dem Extrazellulärraum in die β -Zelle ein und bewirken, dass insulinspeichernde Granula an die Zellmembran wandern, wo schließlich durch Exozytose Insulin freigegeben wird (Henquin 2000; Macdonald et al. 2005). Die Insulinsynthese und -sekretion wird durch negative und positive Feedbackmechanismen gesteuert (Koranyi et al. 1992; Aspinwall et al. 1999): Das freigesetzte anabole Insulin bewirkt in Leber-, Muskel- und Fettzellen eine Aufnahme der Glucose aus dem Blut, und damit eine Senkung des Blutglucosespiegels. Die aufgenommene Glucose kann dann wiederum in der Leber in Form von Glykogen gespeichert oder in Energie umgeformt werden. Außerdem hemmt Insulin in den Fettzellen die Lipolyse.

1.1.2. Die Ätiologie und Komplikationen des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus, »honigsüßer Durchfluss«, ([griech.] *διαβήτης* »hindurchgehen« [lat.] *mellitus* »honigsüß«) ist eine schwerwiegende chronische Stoffwechselkrankheit, bei der es zu einem gestörten Glucosehaushalt und als Leitsymptom zu einem erhöhten Glucosespiegel im Blut kommt. Die Inzidenz und Prävalenz des Diabetes mellitus ist sehr hoch. Er gehört zu denjenigen Erkrankungen, die global am stärksten zunehmen. Im Jahre 2012 waren weltweit 371 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, und Schätzungen zufolge werden im Jahre 2030 552 Millionen Menschen vom Diabetes mellitus betroffen sein (IDF 2012). In den entwickelten Ländern liegt die Prävalenz mittlerweile bei 6 %. Damit stellt Diabetes mellitus eines der größten Gesundheitsprobleme des 21. Jahrhunderts dar und ist deshalb auch von enormer wirtschaftlicher Bedeutung (King et al. 1998; Zimmet et al. 2001; Giannini et al. 2009; IDF 2012). Die *World Health Organization* (WHO) gab 1985 erstmals eine Klassifikation und Definition des Diabetes mellitus heraus, die dann 1997 und 1999 von der *American Diabetes Association* (ADA) und der *Japan Diabetes Society* (JDS) verändert und ergänzt wurde (Tominaga 1999). Demnach wird der Diabetes mellitus je nach Ätiologie in vier verschiedene Formen unterteilt (ADA 2009): Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2, andere Diabetesformen (Typ 3) und der Gestationsdiabetes (Typ 4). Ungefähr 5 % entfallen dabei auf den Typ-1-Diabetes, der auch juveniler Diabetes genannt wird, da die Patienten schon in jungem Alter betroffen sind. Er beruht auf einer irreversiblen Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, die meist durch Autoimmungeschehen (90 %, Typ 1 a) oder

aber idiopathisch (Typ 1 b) bedingt ist. Selten gibt es auch Patienten, bei denen in höherem Alter ein Typ-1-Diabetes diagnostiziert wird, der sog. *Latent Autoimmune Diabetes of the Adult* (LADA). Die Zerstörung der β -Zellen beim Typ 1 führen zu einem absoluten Mangel an Insulin, welcher die Patienten lebenslänglich insulinpflichtig macht. Andere Diabetesformen (Typ 3) sind durch genetische Defekte (z. B. MODY, *maturity-onset diabetes of the young*), Pankreatitis, Infektionen, Medikamente oder Syndrome bedingt. Der Gestationsdiabetes (Typ 4) kommt bei 3 % aller Schwangeren vor. Es handelt sich hierbei um eine meist vorübergehende Glucosestoffwechselstörung, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen und Langzeitschäden sowohl bei der Mutter als auch bei dem Kind führen kann (Langer 1993; Cdc 1998). Ungefähr 90 % der Diabetiker sind jedoch vom Typ-2-Diabetes betroffen, welcher mit peripherer Insulinresistenz und relativem Insulinmangel bei unzureichender Insulinsekretion einhergeht. Typ-2-Diabetiker sind meist höheren Alters («Altersdiabetes»), obwohl auch immer mehr junge Menschen betroffen sind (Pinhas-Hamiel et al. 1996). Der Diabetes mellitus Typ 2 ist mit dem Metabolischen Syndrom (viszerale Adipositas, erhöhte Blutfettwerte, Hypertonus) vergesellschaftet. Außerdem spielen eine unzureichende körperliche Bewegung sowie genetische Prädisposition bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle (Stumvoll et al. 2005). Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine langsam progrediente Erkrankung, sodass Patienten oft erst nach Jahren körperliche Symptome wahrnehmen. Aber gerade weil die Diagnose oft sehr spät gestellt wird, ist die Gefahr irreversibler Schädigungen groß. Die langfristigen Komplikationen des Diabetes mellitus ergeben sich als Folge einer Mikro- und Makroangiopathie im Herz-/Kreislaufsystem (Hypertonus, Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt), im Gehirn (ischämischer Hirninfarkt), in den peripheren Gefäßen (pAVK, peripher arterielle Verschlusskrankheit), in den Augen (diabetische Retinopathie), in den Nieren (diabetische Nephropathie), in den Füßen (diabetisches Fußsyndrom) und im Nervensystem (diabetische Neuropathie) (Johnson und Taylor 1990).

1.1.3. Die Pathophysiologie des Diabetes mellitus

Es gibt verschiedene pathophysiologische Mechanismen, die zum Entstehen des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen (Stumvoll et al. 2005). Generell gesehen ist beim Diabetes mellitus die Insulinmenge und -wirkung nicht ausreichend, um den Bedarf des Körpers zu decken. Es existiert ein relativer Insulinmangel mit erhöhtem Blutglucosespiegel.

Die prädiabetische Stoffwechsellage ist zunächst gekennzeichnet durch eine periphere Insulinresistenz, eine absolute Hyperinsulinämie und vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Periphere Insulinresistenz bedeutet, dass die Wirkung von Insulin an Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe vermindert ist. Dadurch wird weniger Glucose in den Muskel aufgenommen, die Leber steigert die Glucoseproduktion. Im Fettgewebe ist die Lipolyse erhöht mit einer sich daraus ergebenden Hyperlipidämie und einem erhöhten Fettsäurespiegel. Viszerale Adipositas und mangelnde Bewegung sind ein wichtiger, die Insulinresistenz begünstigender Faktor (Kahn 2003); Gewichtsreduktion bewirkt ein deutliches Absinken des Blutglucosespiegels und verlangsamt die Progredienz des Diabetes.

Die Insulinresistenz wird jahrelang kompensiert durch eine gesteigerte Insulinsynthese und -sekretion. Dies geht einher mit einer Hyperplasie und Hypertrophie der Langerhans-Inseln und damit einer Zunahme der β -Zellmasse (Butler et al. 2003a; Rhodes 2005; Kahn et al. 2009). Es kann eine absolute Hyperinsulinämie nachweisbar sein, obwohl die Produktion an Insulin den Bedarf des Körpers kaum noch decken kann (Donath und Halban 2004).

Klinisch manifest wird der Diabetes, wenn die β -Zellen die zum Ausgleich der Insulinresistenz erforderlichen Mengen an Insulin nicht mehr genügend produzieren können. Ursächlich ist die Dekompensation der β -Zellen: Erst bei einem 50%igen Verlust der funktionellen β -Zellmasse kommt es zu einem erhöhten Nüchternblutzucker (Weir und Bonner-Weir 2004; Kahn et al. 2009). Die molekularen Mechanismen, die zu der Dekompensation der β -Zelle führen, sind nur zum Teil erforscht und derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Der progrediente Verlust der funktionellen β -Zellmasse beruht einerseits auf einer vermehrten Apoptose der β -Zellen, andererseits auf einem Verlust ihrer Funktion (Insulinproduktion und -sekretion) (Butler et al. 2003b; Maedler und Donath 2004).

Als ursächlich für eine vermehrte Apoptose der β -Zellen wird der permanent erhöhte Blutzuckerspiegel diskutiert (Donath et al. 1999; Federici et al. 2001; Maedler et al. 2001). Diese sog. Glucosetoxizität fördert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit von oxidativem Stress. Sie führt zu einer Aktivierung des JNK- und p38-Signalweges. Die Signalwege werden durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine zusätzlich verstärkt und münden schließlich in β -Zell-Dysfunktion und -Apoptose (Donath et al. 2005; Kaneto et al. 2005b; Kaneto et al. 2005a; Maedler et al. 2008). Auch die chronische Hyperlipidämie (sog. Lipotoxizität) kann zu einer Fettsäure-induzierten Apoptose der β -Zellen führen (Poitout 2008).

Die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion wird bei fortschreitendem Diabetes mellitus immer schlechter. Dabei sind sowohl die Insulinsynthese als auch die Insulinsekretion inadäquat. Typ-2-Diabetiker zeigen eine verzögerte Insulinsekretion nach Glucosegabe (Bergstrom et al. 1990; Kahn 2003) und eine gestörte pulsatile Freisetzung von Insulin (Polonsky et al. 1988). Schließlich kann die funktionelle β -Zellmasse soweit reduziert sein, dass der Patient permanent insulinpflichtig wird (Weir und Bonner-Weir 2004). Die Verminderung der Insulinsynthese ist durch verminderte DNA-Bindung (Poitout et al. 1996) von β -zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren an das Insulingen und/oder verminderter Translation zu verstehen. Dies ist unter anderem durch erhöhte Glucose- und Fettsäurespiegel (Glucotoxizität und Lipotoxizität) (Poitout und Robertson 2002) und Stress (Harmon et al. 2005) bedingt. Für die Aufklärung der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 ist die Kenntnis der die Insulinsynthese betreffenden Mechanismen essentiell.

1.2. Insulinbiosynthese

1.2.1. Das humane Insulingen

Zum Verständnis des Verlustes an β -Zellfunktion im Sinne verminderter Insulinbiosynthese ist die Kenntnis der die Insulingentranskription regulierenden Signale von enormer Bedeutung. Insulin wird nur in den β -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln synthetisiert (Ohneda et al. 2000; Melloul et al. 2002). Dabei wird das Insulingen zunächst in *messenger-RNA* (mRNA) transkribiert und am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu Präproinsulin translatiert. Präproinsulin besteht der Reihe nach aus Signalsequenz, B-Kette, C-Peptid und A-Kette. Anschließend folgt die Prozessierung des Moleküls: es wird gefaltet und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Beim Austreten aus dem ER entsteht durch Abspaltung der Signalsequenz das Proinsulin. Durch Herausschneiden des C-Peptides mithilfe von Peptidasen entsteht das 51 Aminosäuren große Insulin, welches mit Zink-Ionen komplexiert (Blundell et al. 1971) und in Granula gespeichert wird (Hersberger et al. 2009).

Einige Spezies (z. B. die Nagetiere) besitzen zwei Insulingene. Die meisten Spezies, darunter auch der Mensch, haben jedoch nur ein Insulingen. Das humane Insulingen ist auf dem Chromosom 11p15.5 lokalisiert und besitzt drei Exons und zwei Introns (Harper et al. 1981; Ohneda et al. 2000). Die humane Insulingentranskription wird hauptsächlich durch eine Promotorsequenz ca. 400 bp *upstream* des Transkriptionsstarts reguliert.

Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des Insulingenpromotors.



Abb. 1.1: Schematische Darstellung des humanen Insulingenpromotors.

Die Quadrate repräsentieren die cis-regulatorischen Sequenzmodule, welche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren sind. DNA-Bindungsstellen für die β -zellspezifischen Transkriptionsfaktoren sind farblich hervorgehoben (modifiziert nach Melloul et al. 2002 (S. 310), Oetjen et al. 2003b (S. 1291) sowie Hay und Docherty 2006 (S. 3202)).

1.2.2. Die glucoseinduzierte und β -zellspezifische Insulingentranskription

Die β -zellspezifische Expression des Insulins wird durch die komplexe Interaktion verschiedener *second-messenger*-Signale, Hormonstimuli, *trans*-wirkenden Transkriptionsfaktoren und *cis*-regulatorischen Elementen reguliert. Es existieren mehrere Transkriptionsfaktoren, die den Insulingenpromotor aktivieren, aber nur wenige sind tatsächlich β -zellspezifisch. Glucose induziert die Insulinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene (Permutt und Kipnis 1972). Die Mechanismen, wie Glucose die Funktion der Transkriptionsfaktoren moduliert, sind beispielsweise Lokalisation, DNA-Bindungsaffinität und Expression der Transkriptionsfaktoren (Andrali et al. 2008). Als glucoseresponsive *cis*-Elemente im Insulingenpromotor wurden die Elemente A3, C1 und E1 identifiziert (Hay und Docherty 2006). Dies sind DNA-Bindungsstellen für die β -zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Pdx-1, NeuroD1 und MafA. Pdx-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox-1*) ist wichtig für die embryologische Entwicklung und Differenzierung des Pankreas und die glucosestimulierte Insulingentranskription (Kaneto et al. 2008). NeuroD1 (*Neurogenic Differentiation1*), auch BETA2 genannt, ist neben dem Nervensystem auch in dem sich entwickelnden und adulten Pankreas exprimiert. Pdx-1- und NeuroD1-homozygote *knockout*-Mäuse zeigen Pankreasentwicklungsstörungen und sterben früh (Jonsson et al. 1994; Naya et al. 1997). Außerdem sind Pdx-1- und NeuroD1-Punktmutationen assoziiert mit einem MODY (Stoffers et al. 1997; Malecki et al. 1999).

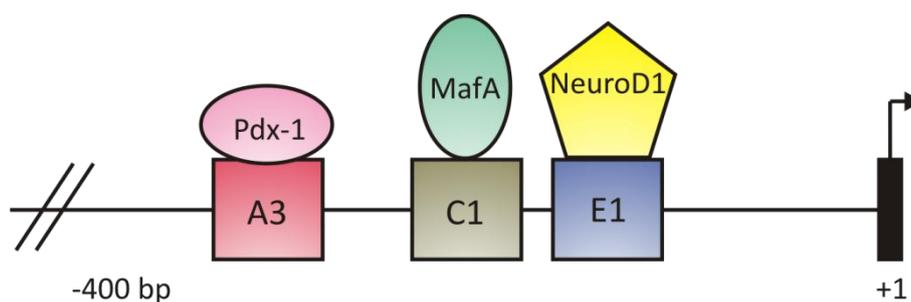


Abb. 1.2: Koordinierte und synergistische Aktivierung des Insulins.

Die drei Transkriptionsfaktoren Pdx-1, MafA und NeuroD1 aktivieren die Insulingentranskription als Antwort auf ein erhöhtes Glucoseniveau (modifiziert nach Andrali et al. 2008, S. 2).

Es konnte gezeigt werden, dass koordiniertes und synergistisches Zusammenwirken der drei Transkriptionsfaktoren Pdx-1, NeuroD1 und MafA (s. Abb. 1.2) zu einer deutlich erhöhten

Insulingenpromotoraktivität führt (Aramata et al. 2005), wobei vor allem MafA eine entscheidende Rolle in der Aktivierung spielt (Zhao et al. 2005).

1.2.3. Der Transkriptionsfaktor MafA

Nachdem das C1-Element im Insulingenpromotor als β -zellspezifisch und glucoseresponsiv entdeckt und RIPE3b1 (*rat insulin promotor element 3b1*) genannt wurde (Shieh und Tsai 1991; Sharma und Stein 1994), wusste man lange Zeit nicht, welcher Transkriptionsfaktor daran bindet. Erst 2002 wurde herausgefunden, dass MafA der RIPE3b1-bindende Aktivator der Insulingenexpression ist (Kataoka et al. 2002; Olbrot et al. 2002; Matsuoka et al. 2003). Danach wurde RIPE3b1 auch MARE (*maf recognition element*) genannt.

Der Transkriptionsfaktor MafA (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A*) gehört zu der Maf-Familie der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren. MafA-Protein wurde *in vivo* bei Vögeln in neuroretinalen Zellen und bei Säugetieren in pankreatischen β -Zellen sowie *in vitro* in Insulinoma-Zelllinien nachgewiesen (Benkhelifa et al. 1998; Olbrot et al. 2002). Humanes MafA wurde auf den Chromosomen 8q24 und 11p15 lokalisiert (Olbrot et al. 2002). Die MafA-Proteine von Mensch und Maus bestehen aus 351 bzw. 359 Aminosäuren. Sie sind zu 95 % identisch und besitzen C-terminal eine basische und eine Leucin-Zipper-Domäne als DNA-Bindungs- und Homodimerisierungsdomäne. N-terminal ist jeweils eine hoch konservierte Serin/Threonin/Prolin-reiche Transaktivierungsdomäne (Kataoka et al. 2002) lokalisiert, s. Abb. 1.3.

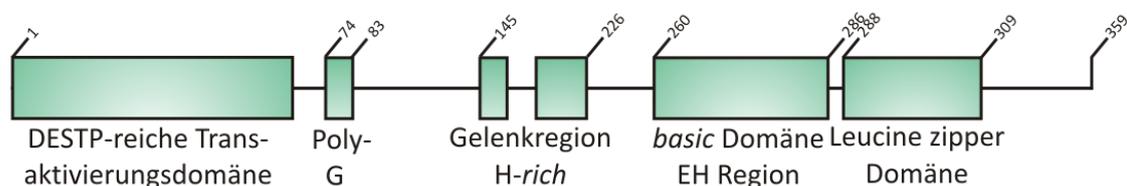


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Primärstruktur von Maus-MafA.

DESTP repräsentiert die Aspartat/Glutamat/Serin/Threonin/Prolin-reiche Transaktivierungsdomäne, EH ist die erweiterte homologe basische Region. Zahlen repräsentieren die jeweilige Aminosäurestelle, Buchstaben repräsentieren die Aminosäuren nach dem Einbuchstabencode (modifiziert nach Kataoka et al. 2002 (S. 49906) und Aramata et al. 2007 (S. 660), GenBank und UniProt Datenbank *accession number* AB086961).

MafA besitzt abhängig von der Spezies eine unterschiedlich apparente Masse von 40 bis 48 kDa (Zhao et al. 2000; Benkhelifa et al. 2001; Olbrot et al. 2002; Han et al. 2007). Neben

MafA gibt es noch weitere Maf-Proteine. C-Maf aktiviert den Glukagongenpromotor in α -Zellen (Kataoka et al. 2004). Auch MafB ist an der Glukagongenexpression in α -Zellen involviert und wird ebenfalls in pankreatischen β -Zellen exprimiert (Matsuoka et al. 2003; Artner et al. 2006). Während MafA im entwickelten bzw. adulten Pankreas vorkommt (nachweisbar ab Embryonaltag 13.5) (Matsuoka et al. 2004), spielt MafB vor allem in der Embryonalentwicklung eine große Rolle. MafA scheint Gene zu kontrollieren, die in der Entwicklung zuerst von MafB reguliert wurden (Nishimura et al. 2006; Artner et al. 2010).

MafA ist einer der Hauptaktivatoren der Insulingentranskription *in vivo* und *in vitro* (Kataoka et al. 2002; Olbrot et al. 2002; Matsuoka et al. 2003; Matsuoka et al. 2004; Zhao et al. 2005; Artner et al. 2008). Eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von MafA führt zu verminderter Insulingentranskription (Oetjen et al. 2007). MafA-homozygote *knockout*-Mäuse besitzen ein reduziertes Level an Insulingentranskription, eine erhöhte Nüchternblutglucose, eine veränderte Inselarchitektur und entwickeln Diabetes (Zhang et al. 2005). Die MafA-mRNA- und Proteinexpression wird durch Glucose reguliert (Kataoka et al. 2002; Zhao et al. 2005; Vanderford et al. 2007). Niedrige Glucosekonzentrationen führen zu verminderter MafA-Transkription, hohe Glucosekonzentrationen stimulieren die Transkription (Andrali et al. 2008). Allerdings ist bei dauerhaft erhöhtem Glucosespiegel, wie beim Diabetes mellitus, die Expression von MafA-Protein vermindert (Sharma et al. 1995; Harmon et al. 2005). Patienten mit Diabetes mellitus weisen vermindertes nukleäres MafA-Protein in den β -Zellen auf (Butler et al. 2012). Auf posttranslationaler Ebene wird MafA vor allem durch Phosphorylierung reguliert (Zhao et al. 2000). Als Phosphoprotein wird MafA durch verschiedene Kinasen phosphoryliert (Benkhelifa et al. 2001; Sii-Felice et al. 2005; Han et al. 2007; Rocques et al. 2007; Guo S et al. 2009; Kondo et al. 2009). Dabei werden vor allem die Aminosäuren S14, S49, T53, T57, S61, S65 und T134 phosphoryliert. Phosphorylierung führt zu vermehrter Ubiquitylierung und proteasomaler Degradation von MafA (Han et al. 2007). Insbesondere die Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren S49, T53, T57, S61 und S65 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von MafA sind von Bedeutung für seine proteasomale Degradation. Dabei werden die Serin- und Threonin-Aminosäuren sequenziell und kaskadenartig durch GSK-3 vom C- zum N-Terminus phosphoryliert (Aramata et al. 2007; Rocques et al. 2007). Die Kinase, welche Aminosäure S65 phosphoryliert, ist bisher unbekannt.

MafA ist nicht nur in die Insulingentranskription involviert, sondern reguliert auch viele andere Gene, die für eine angemessene Insulinbiosynthese und -sekretion, also für die Funktion der β -Zelle, wichtig sind. MafA erhöht das mRNA-Level der als Glucosensoren agierenden Glucokinase. Es erhöht und reguliert die Expression von GLUT2 und Pdx-1 (Samaras et al. 2003; Matsuoka et al. 2007; Wang H et al. 2007). MafA-defiziente Mäuse haben verminderte Transkripte von GLUT2 und Pdx-1 (Zhang et al. 2005).

Die Insulinbiosynthese ist eine wichtige Funktion der pankreatischen β -Zelle, und der Diabetes mellitus ist durch einen progredienten Verlust an funktioneller β -Zellmasse gekennzeichnet. MafA ist ein wichtiger Faktor, der zur Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion beiträgt. Daher ist eine Protektion von MafA von enormer Bedeutung für eine mögliche therapeutische Hemmung der Progredienz des Diabetes mellitus.

1.3. Signaltransduktion

1.3.1. Der MAPK-Signalweg

Innerhalb der Zell-Kommunikation spielt die MAP-Kinase-Kaskade (*mitogen activated protein*) eine wichtige Rolle. Sie ist einer der wichtigsten Signalwege für die Regulation der Zellteilung, Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose; sie ist hoch konserviert und in allen eukaryontischen Organismen vorhanden (Robinson und Cobb 1997; Friedrich und Behrmann 2009). Extrazelluläre Signale werden nach Ligandenbindung an den Rezeptor innerhalb der MAP-Kinase-Signalkaskade weitergeleitet und bis in den Zellkern hinein in eine zelluläre Antwort übersetzt. Dabei wird zunächst die inaktive mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) an ihren Serin- und Threoninresten phosphoryliert und aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die dualspezifische MAP-Kinase-Kinase (MAPKK, MKK) bzw. auch MAP- und ERK-Kinase (MEK) genannt, welche ihrerseits die inaktive MAP-Kinase (MAPK) an ihren Serin- und Threoninresten phosphoryliert und aktiviert (Garrington und Johnson 1999), s. Schema in Abb. 1.4. Die MAPK kann dann weitere Substrate wie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und durch veränderte Proteinstabilität, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität regulieren (Treisman 1996). Die Transkriptionsfaktoren wiederum lösen die zellspezifische Antwort, z. B. Apoptose oder Entzündung, aus.

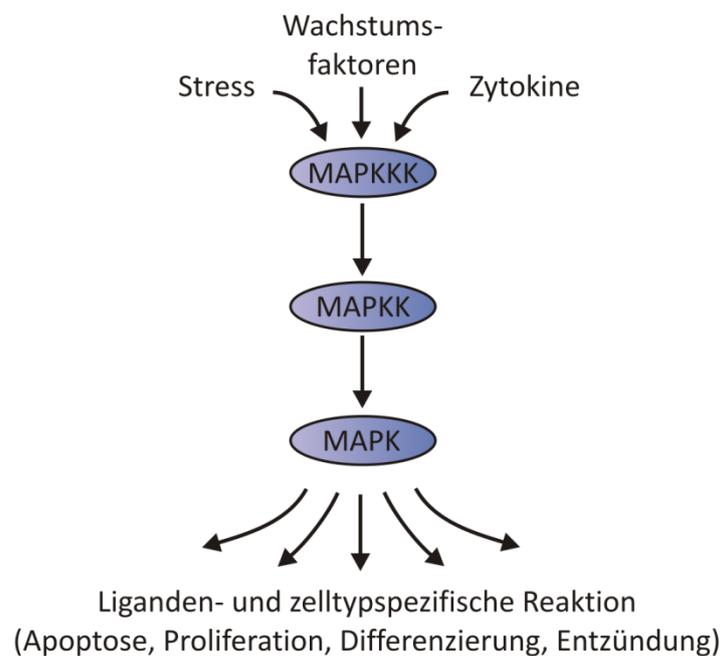


Abb. 1.4: Signalkaskade der MAP-Kinasen.

Extrazelluläre Signale wie Stress, Wachstumsfaktoren und Zytokine führen zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade. Dabei phosphoryliert und aktiviert die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK), welche wiederum die MAP-Kinase (MAPK) aktiviert. Die MAPK aktiviert weitere Substrate, die dann wiederum für die Liganden- und zelltypspezifische Reaktion verantwortlich sind.

Es gibt drei verschiedene Hauptsäulen der MAP-Kinase-Kaskade, welche einerseits separat linear, andererseits zu einem Signalnetzwerk verknüpft ablaufen können (Robinson und Cobb 1997): Die ERK-Kinasen (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*), die p38-Kinasen und JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*). Dabei werden der p38- und der JNK-Signalweg auch als SAPK-Signalweg (*Stress-Activated Protein Kinases*) bezeichnet. Die MAPK-Signalkaskade kann durch unspezifische extrazelluläre Stresssignale wie Hitzeschock, UV-Strahlung, Redoxstress, proinflammatorische Zytokine, osmotisches Ungleichgewicht, Ischämie und Axonschädigung sowie durch spezifische Ligandenbindung, z. B. durch Wachstumsfaktoren, aktiviert werden. Ebenfalls kann der MAPK-Signalweg intrazellulär durch sog. *crossstalk* von anderen Signalwegen aktiviert werden (Robinson und Cobb 1997).

Der JNK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Progression des Diabetes mellitus Typ 2. Aktiviert vor allem durch oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine, ist er beteiligt an der peripheren Insulinresistenz und der β -Zell-Dysfunktion im Sinne einer verminderten Insulingenexpression und -sekretion (Kaneto et al. 2002; Kaneto et al. 2005b; Kaneto et al. 2005a).

1.3.2. Die Dual Leucine-Zipper Kinase

Die Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK) wurde 1994 von Holzman et al. aus Mausnieren isoliert. Sie ist ein 888 Aminosäuren großes Protein mit einer apparenten Masse von 130 kDa (rechnerisch 96 kDa). Das DLK-Gen ist auf dem Maus-Chromosom 15 lokalisiert (Watanabe et al. 1997). Die DLK gehört zu der Familie der *Mixed-Lineage Kinases* (MLK), einer Subfamilie der MAPKKK (Gallo und Johnson 2002) und besitzt eine für die MLKs typische Primärstruktur (s. Abb. 1.5) (Dorow et al. 1993; Holzman et al. 1994).

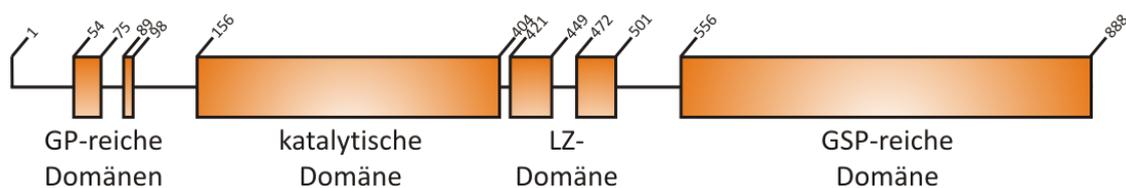


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK.

GP repräsentiert die Glycin/Prolin-reiche Domäne, LZ die Leucine-Zipper-Domäne und GSP Glycin/Serin/Prolin-reiche Domäne. Zahlen repräsentieren die jeweilige Aminosäurestelle, Buchstaben repräsentieren die Aminosäuren nach dem Einbuchstabencode (modifiziert nach Holzman et al. 1994, S. 30813).

Die MLKs lassen sich in verschiedene Subgruppen unterteilen: MLK1, MLK2, MLK3, MLK4, ZPK (*Leucine-Zipper Protein Kinase*) und eine große Gruppe verschiedener Homologe der DLK. Aus Ratten konnte MUK isoliert werden (*MAPK Upstream Kinase*) (Hirai et al. 1996), aus *Drosophila melanogaster* Wallenda (Collins et al. 2006), aus *Caenorhabditis elegans* DLK-1 (*DAP (Death associated Protein Kinase) Like Kinase*) (Nakata et al. 2005) und aus dem Menschen ZPK (Reddy und Pleasure 1994). Zu der aus dem menschlichen Kleinhirn isolierten LZK (*Leucine-Zipper Bearing Kinase*) (Sakuma et al. 1997) ist die DLK strukturell verwandt.

Die DLK besitzt zwei Leucin/Isoleucin-Zipper Domänen. Die Leucin-Zipper-Domäne dient in diesem Fall der Protein-Protein-Interaktion durch Homodimerisierung (Nihalani et al. 2000). Sowohl N- als auch C-terminal besitzt die DLK glycin- und prolinreiche Sequenzen. Zwischen den Aminosäuren (AS) 156 und 404 befindet sich die katalytische Domäne, die die DLK in der Primärstruktur als Serin/Threonin- und Thyrosin-Kinase, funktionell jedoch nur als Serin/Threonin-Kinase auszeichnet (Holzman et al. 1994). Innerhalb dieser Domäne an AS 185 (Lysin) ist die ATP-Bindungsstelle lokalisiert. Des Weiteren gibt es eine zweigeteilte nukleäre Kernerkennungssequenz (NLS, *nuclear localisation signal*) zwischen den AS 186 und 200 (Wallbach 2010).

Die DLK konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. So wird sie in sich entwickelndem Epithelgewebe der Niere, der Leber, der Haut (in Keratinozyten), des Hodens und des Darmes sowie in Adipozyten und insbesondere in neuronalen Zellen (Gehirn, Spinalganglien) exprimiert (Holzman et al. 1994; Blouin et al. 1996; Nadeau et al. 1997; Germain et al. 2000; Hirai et al. 2005; Robitaille et al. 2005; Couture et al. 2009). Außerdem konnte DLK in der pankreatischen β -Zelllinie HIT-T15 und in primären Maus-Pankreasinseln nachgewiesen werden (Oetjen et al. 2006). In Neuronen existiert die DLK im Nukleus (Merritt et al. 1999) und in den synaptischen Enden in einer zytoplasmatischen und in einer plasmamembranassoziierten Form (Mata et al. 1996). In Fibroblasten konnte sie im Nukleus, im Zytoplasma und Golgi-Apparat-assoziiert nachgewiesen werden (Douziech et al. 1999; Hebert et al. 2000); in primären pankreatischen Maus-Inseln wurde sie im Zytoplasma und Nukleus detektiert (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe).

MLK besitzen eine autokatalytische Aktivität und können mithilfe ihrer Leucin-Zipper homodimerisieren (Gallo und Johnson 2002). Mata et al. (1996) haben gezeigt, dass die DLK *in vivo* autophosphoryliert und unter reduzierenden Bedingungen bei 130 kDa in einer SDS-PAGE migriert. Mutation von Lysin in Alanin an der ATP-Bindungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne (Mutante DLK K185A) verhindert eine ATP-Bindung. Dadurch wird die DLK katalytisch inaktiv und ist unfähig zu phosphorylieren (Mata et al. 1996).

Die Autophosphorylierung der DLK reguliert auch deren Aktivierung (Nihalani et al. 2000); Dephosphorylierung, z. B. durch Calcineurin, kann zu einer Hemmung der DLK-Aktivität führen (Plaumann et al. 2008). Behandlung von Zellen mit Vanadat, einem Tyrosinphosphatase-Inhibitor, resultiert in Phosphorylierung und Aktivierung der DLK (Daviau et al. 2009). Autophosphorylierung der DLK führt zu Aktivierung des JNK-Signalweges (Nihalani et al. 2000). In verschiedensten Geweben aktiviert DLK den JNK- und p38-Signalweg (Fan et al. 1996; Tanaka und Hanafusa 1998; Merritt et al. 1999; Robitaille et al. 2005; Hirai et al. 2006; Oetjen et al. 2006). DLK-*knockdown* führt zu verminderter Phosphorylierung und Aktivierung von JNK (Hirai et al. 2002; Eto et al. 2009). DLK aktiviert MKK4 und MKK7 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4/7), welche wiederum Aktivatoren von JNK sind. Die JNK-Aktivierung der DLK geschieht demnach wahrscheinlich indirekt über die Aktivierung von MKK4 und MKK7 (Hirai et al. 1997; Merritt et al. 1999), siehe Abb. 1.6. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeits-

gruppe zeigen, dass die DLK in β -Zellen durch prädiabetische Signale wie oxidativen Stress (Wasserstoffperoxid) und proinflammatorische Zytokine (TNF α , Tumor-Nekrose-Faktor α) aktiviert wird.

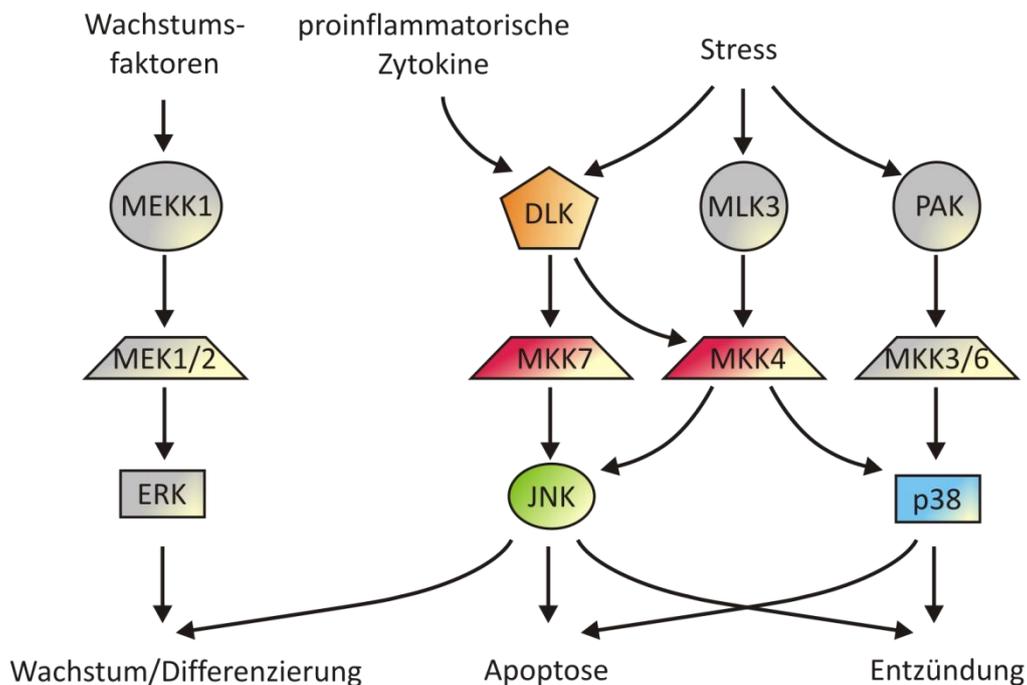


Abb. 1.6: Rolle der DLK innerhalb der MAPK-Signalkaskade.

DLK wird aktiviert durch übergeordnete Signale wie proinflammatorische Zytokine und Stress. Über eine Phosphorylierung von MKK4/7 führt sie zu einer Aktivierung von den MAP-Kinasen JNK und p38. Erläuterungen zu den Abkürzungen sind im Text und im Abkürzungsverzeichnis enthalten (modifiziert nach Garrington und Johnson 1999, S.212).

In der Zelle liegt DLK in seiner monomeren, nicht-phosphorylierten und inaktiven Form assoziiert an die Adapterproteine IB/JIP-1 (*Islet Brain/JNK Interacting Protein-1*) (Nihalani et al. 2000; 2001; 2003) und POSH (*Plenty of SH3*) (Xu et al. 2003; Kukekov et al. 2006) vor. Nicht nur Phosphorylierung, sondern auch Bindung der DLK an sein Adapterprotein JIP reguliert die Aktivität der DLK (Nihalani et al. 2001; Nihalani et al. 2003). Phosphorylierung von JIP durch Src-Kinasen führt zu vermehrter Bindung von JIP an die DLK, sodass die DLK inaktiv bleibt (Nihalani et al. 2007). Im Gegensatz dazu führt eine Phosphorylierung von JIP durch JNK zu einer Dissoziation der DLK von dem Adapterprotein ins Zytoplasma. Dadurch homo-dimerisiert die inaktive DLK, wird katalytisch aktiv und phosphoryliert MKK7, die wiederum JNK aktiviert (Nihalani et al. 2001; Nihalani et al. 2003). JNK ist demnach in einer positiven Rückkopplungsschleife involviert, indem es DLK aktiviert (Xu et al. 2005).

Die DLK scheint vor allem wichtig für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der Funktion der Zellen zu sein. Homozygote DLK $-/-$ Knockout-Mäuse, die mittels homologer Rekombination bzw. *gene targeting* generiert wurden, überlebten zwar die Embryonalperiode, starben aber perinatal an den Folgen einer verminderten Hirnentwicklung (Hirai et al. 2006). Die vordere und hintere Kommissur, Corpus callosum, lateraler Riechtrakt, Cingulum, Capsula interna und kortikale Axone waren kaum ausgebildet. Neben Hirai et al. (2002; 2006) fanden auch andere Arbeitsgruppen einen Zusammenhang der DLK mit Migration und Differenzierung von Neuronen: Axon-Wachstum und -Transport wird durch die DLK bzw. Wallenda reguliert (Horiuchi et al. 2007; Eto et al. 2009), Axon-Degeneration von Neuronen ist bei DLK-Mutation vermindert (Miller et al. 2009). Axon-Regeneration und Synapsen-ausbildung werden durch DLK-1 reguliert (Abrams et al. 2008; Hammarlund et al. 2009; Yan et al. 2009). Auch Collins et al. (2006) konnten einen Effekt von Wallenda auf die Entwicklung von Synapsen nachweisen. Dominant negative DLK-Mutanten hemmen über verminderte c-Jun-Phosphorylierung die Apoptose in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra *in vivo* (Xu et al. 2001; Chen X et al. 2008). In Keratinozyten und Fibroblasten hemmt das humane Homolog der DLK, die ZPK, das Zellwachstum (Bergeron et al. 1997; Germain et al. 2000) und spielt bei der terminalen Differenzierung der Keratinozyten in der Epidermis eine Rolle (Robitaille et al. 2005); es wird dort als Differenzierungsmarker verwendet (Carrier et al. 2009). Auch die Adipozyten-Differenzierung wird durch die DLK reguliert (Couture et al. 2009). DLK wird außerdem in einer HCC-Zelllinie (*Hepatocellular Carcinoma*) exprimiert (Kim et al. 2004).

CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist ein β -Zell-protektiver Transkriptionsfaktor: Transgene CREB-dominant-negative-Mäuse werden durch eine vermehrte β -Zell-Apoptose diabetisch (Jhala et al. 2003). Die Hemmung der CREB-abhängigen humanen Insulingentranskription in der β -Zelllinie HIT und primären Inselzellen führt zu β -Zell-Dysfunktion (Oetjen et al. 2003a; Oetjen et al. 2003b). Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben außerdem gezeigt, dass die Überexpression der DLK in einer β -Zelllinie einen hemmenden Effekt auf die CREB-abhängige Gentranskription hat (Oetjen et al. 2006; Phu Do et al. 2011) und dass die Überexpression der DLK einen apoptotischen Zelltod induziert (Plaumann et al. 2008). Es ist bekannt, dass Zytokine, wie sie im Rahmen einer

prädiabetischen Stoffwechsellage vorliegen, in β -Zellen zu Apoptose führen (Donath et al. 2003; Grunnet et al. 2009). Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin TNF α sowie Wasserstoffperoxid als reaktive Sauerstoffspezies über eine Aktivierung der DLK zu einer β -Zell-Apoptose führt und das proinflammatorische Zytokin IL-1 β in einer β -Zelllinie die Transkription des humanen Insulingenes und die MafA-Aktivität hemmt (Oetjen et al. 2007). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der DLK und einer β -Zelldysfunktion im Sinne verminderter Insulingentranskription beim Diabetes mellitus war nun Gegenstand näherer Untersuchungen.

1.4. Zielsetzung

Unveröffentlichte Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine spezifische Hemmung der DLK mittels siRNA (*small interference RNA*) zu einer deutlich erhöhten Insulingentranskription in einer pankreatischen β -Zelllinie führt und Überexpression der DLK die Insulingentranskription hemmt. Mithilfe von 5'- und 3'-Promotordeletionsanalysen konnte RIPE3b1, die DNA-Bindungsstelle für MafA, als DLK-responsives Element identifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die zugrundeliegenden Mechanismen der hemmenden Wirkung der DLK auf den Transkriptionsfaktor MafA untersucht werden. Dazu sollte im Einzelnen exploriert werden:

- die Wirkung der DLK auf die MafA-abhängige Insulingentranskription
- die Stabilität der Proteine DLK und MafA
- die Wirkung der DLK auf die Proteinstabilität von MafA
- die Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität des Glucokinasepromotors
- die Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Promotors.

Dazu wurden in der Insulin-produzierenden β -Zelllinie HIT sowie der Nicht- β -Zelllinie JEG transiente Transfektionen mit Reportergenassays und Immunoblotanalysen durchgeführt.

Außerdem sollten Plasmide für die Herstellung von DLK-Adenoviren kloniert werden.

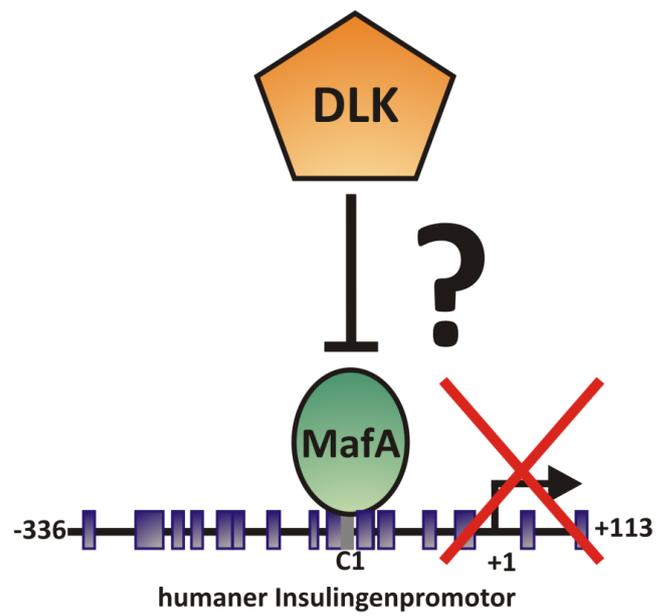


Abb. 1.7: Fragestellung: Was sind die zugrundeliegenden Mechanismen der hemmenden Wirkung der DLK auf den β -zellspezifischen Transkriptionsfaktor MafA?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1. Geräte

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoclav Systec VX150	Systec, Wettenberg
AutoLumat LB935 Luminometer	E&G Berthold, Bad Wildbach
Bakterien Inkubator 37 °C	Heraeus Sepatech, Langenselbold
Beckman J2HS Zentrifuge	Beckman, München
Beckman L8-70M Ultrazentrifuge	Beckman, München
Beckman Tube Sealer	Beckman, München
Bioclav	Schütt, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Langenselbold
Biometra® Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Blot Kammer	Amersham Biosciences, Freiburg
Certomat®HK Temperaturregulierer	Sartorius, Göttingen
Certomat®R Schüttelplattform	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator STERI CULT 200	Forma Scientific Inc., San Bruno, USA
DryGel Sr Slab Gel Dryer SE1160	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Electrophoresis chamber SE 600	Hoefer Scientific Instruments,

	San Francisco, USA
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluorometer Fusion™	Canberra-Packard, Dreieich
GelDoc™ XR Molecular Imager	Bio-Rad, München
Innova™4300 Incubator	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Inverses Mikroskop TMS-F	Nikon, Tokio, Japan
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Langenselbold
MicroPulser™	Bio-Rad, München
Mighty Small™ Dual gel caster SE 245	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Nano Drop™	peqlab, Erlangen
PCR cycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetten (10 µl / 20 µl / 200 µl / 1 000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus®-akku	Hischmann Laborgeräte, Eberstadt
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Hess.-Oldendorf
Rocking platform	Biometra, Göttingen
Schüttelgerät	Jahnke & Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen
Sigma 3K30 Kühlzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz
Spektralphotometer UV-160	Shimadzu GmbH, Duisburg
SteriGard Zellkulturbank	The Baker Company Inc., Stanford, USA

Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator Biometra Ti1	Biometra, Göttingen
VersaDoc™ Molecular Imager	Bio-Rad
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Hänigsen
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen

2.1.2. Verbrauchsmaterial

10-cm-Agar-Platten	Greiner Bio One, Solingen
6-well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96-well-PCR-Platte	Applied Biosystems, Darmstadt
96-well-Platte	Greiner Bio One, Solingen
BD Falcon™-Röhrchen (15 ml / 50 ml)	Schuett24 GmbH, Göttingen
BD Falcon™-Zellkulturschale (6 cm / 10 cm / 15 cm)	Schuett24 GmbH, Göttingen
Dialysierschlauch	Invitrogen, Karlsruhe
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvette (2 mm)	peqlab, Erlangen
Eppendorf-Reaktions-Gefäße (200 µl / 1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filter Minisart (200 µm)	Sartorius, Göttingen
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kanülen (20 G / 27 G)	Braun, Melsungen
Kunststoffküvetten (1 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Labortücher	Kimberley-Clark, Reigate, UK
Luminometerröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Stuttgart
Nitrozellulosemembran (Hybond ECL™)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Parafilm® M	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (200 µL, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-Lock PCR Gefäße (0,2 ml / 0,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (5ml / 10 ml / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (5 ml)	Braun, Melsungen
Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal)	Beckman, München
Whatmanpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.2. Biologische und chemische Materialien

2.2.1. Chemikalien

Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
APS	AppliChem, Darmstadt
ATP	AppliChem, Darmstadt
Bisacrylamid	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
BSA (Albumin Fraktion V)	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
CsCl	AppliChem, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-Saccharose	AppliChem, Darmstadt
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Eisessig	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerin (87 %)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt

Glycogen	AppliChem, Darmstadt
Glycylglycin	AppliChem, Darmstadt
HCl	AppliChem, Darmstadt
HEPES	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
KCl	AppliChem, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferin	Promega, Mannheim
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
METAFACTENE™	Biontex, München
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl ₂	AppliChem, Darmstadt
MgSO ₄	AppliChem, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
NaOH	AppliChem, Darmstadt
NP-40	AppliChem, Darmstadt
PEG 6 000	AppliChem, Darmstadt

Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.2.2. Enzyme

Trypsin/EDTA-Lösung (aus Rinderpankreas)		GIBCO BRL, Karlsruhe
Lysozym (aus Hühnereiweiß)		AppliChem, Darmstadt
CIAP	1 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	2,5 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	10 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot, NEB, Frankfurt a. M.
RNAseA	10 mg/ml	Quiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	1 U/ μ l	Fermentas, St. Leon-Rot

T4 DNA Ligase, *Pfu* DNA Polymerase, CIAP und alle Enzyme für einfachen oder doppelten Restriktionsverdau von Doppelstrang-DNA sind in Kombination mit dem jeweils empfohlenen Puffer (5 x, 10 x, 100 x) und BSA (100 x) entsprechend den Herstellerhinweisen verwendet und bei -20 °C gelagert worden.

2.2.3. Puffer und Stammlösungen

Acrylamid 30 % 29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid wurden abgewogen und in

	100 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei 4 °C.
Ampicillin 5 %	500 mg Ampicillin wurden in 10 ml H ₂ O gelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.
APS 10 %	1 g APS in wurden in 10 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei -20 °C.
ATP 200 mM	MG = 605,2; 1,1 g ATP wurden in 10 ml H ₂ O gelöst, zu je 60 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.
Borsäure 2 M	MG = 61,83; 61,83 g Borat wurden in 50 ml H ₂ O gelöst und bei RT gelagert.
CaCl ₂ 50 mM	0,735 g CaCl ₂ wurden in 100 ml H ₂ O gelöst und autoklaviert. Lagerung bei RT.
DTT 1 M	MG = 154,25; 1,5425 g DTT wurden in 10 ml H ₂ O gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
EDTA 0,5 M	MG = 372,24; 46,53 g EDTA wurden in 250 ml H ₂ O gelöst, die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 titriert. Lagerung bei RT.
EGTA 180 mM	MG = 380,35; 6,85 g EGTA wurden in 100 ml H ₂ O gelöst. Erst nach Einstellen des pH-Wertes mit 2 N NaOH auf 8,0 löste sich das EGTA vollständig. Lagerung bei RT.
Glucose 0,5 M	MG = 180,16; 9 g Glucose wurden in 100 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
Glycin 200 mM	MG = 75,07; 7,51 g Glycin wurden in 500 ml H ₂ O gelöst und bei RT gelagert. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 2,5 titriert.
Glycogen 1 %	10 mg Glycogen wurden in 1 ml H ₂ O gelöst und bei -20 °C gelagert.
Glycylglycin 0,5 M	MG = 132,12; 13,212 g Glycylglycin wurden in 200 ml H ₂ O gelöst, die Lösung wurde mit 10N NaOH auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt. Lagerung bei RT.
HCl 6 N	H ₂ O wurde vorgelegt und die gleiche Menge konz. HCl hinzugefügt. Lagerung bei RT.

HEPES 0,5 M	MG = 238,31; 11,91 g HEPES wurden in 100 ml H ₂ O gelöst und mit 10 N NaOH auf den pH-Wert von 7,5 eingestellt. Lagerung bei RT.
Kanamycin 5 %	500 mg Kanamycin wurden in 10 ml H ₂ O gelöst, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.
K ₂ HPO ₄ 1 M	MG = 174,18; 8,71 g K ₂ HPO ₄ wurden in 50 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
KH ₂ PO ₄ 1 M	MG = 136,09; 6,81 g KH ₂ PO ₄ wurden in 50 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
MgCl ₂ 1 M	MG = 203,3; 20,33 g MgCl ₂ wurden in 100 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
MgSO ₄ 1 M	MG = 246,48; 24,648 g MgSO ₄ wurden in 100 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
NaCl 5 M	MG = 58,44; 292,2 g NaCl wurden in 1 l H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
NaOH 2 N	MG = 39,99; 79,994 g wurden vorsichtig in 1 l H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
NP-40 10 %	10 ml NP-40 wurden in 100 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
SDS-Lösung 10 %	1 g SDS wurde in 10 ml H ₂ O gelöst. Lagerung bei RT.
Tris 1 M	MG = 121,14; 60,57 g Tris wurden in 500 ml H ₂ O gelöst, die Lösung wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt (pH 6,8 / pH 7,4 / pH 7,5 / pH 8). Lagerung bei RT.
Triton X-100 10 %	10 ml Triton X-100 wurden mit 90 ml H ₂ O vermischt. Lagerung bei RT.

2.2.4. Kits

Bio-Rad Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
Easy Pure [®] DNA Purification	Biozym, Hess. Oldendorf
Big Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2.5. Antikörper

Primäre Antikörper, die für Western Blots benutzt wurden

Name	Spezies	Klon	Hersteller/Referenz
DLK (223 C-terminale AS)	Kaninchen	Polyklonal	Holzman et al. 1994
GAPDH	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA
MafA-BL1069	Kaninchen	Polyklonal	Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, USA
Phospho-SAPK/JNK	Maus	Monoklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA
SAPK/JNK	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Inc. Beverly, USA

Sekundäre Antikörper, die für Immundetektierung bei Western Blots benutzt wurden

Name	Markierung	Herkunft	Hersteller
anti-Maus-IgG-HRP	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	GE Healthcare, UK
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Meerrettich-Peroxidase	Esel	GE Healthcare, UK

Konzentrationen der Antikörper

Name	Konzentration	gelöst in
DLK	1/1 000	Antikörperlösung 1
GAPDH	1/2 000	Antikörperlösung 1
JNK	1/1 000	Antikörperlösung 1
MafA	1/1 000	Antikörperlösung 2
Phospho-JNK	1/500	Antikörperlösung 1
Maus-IgG-HRP	1/10 000	Antikörperlösung 1
Kaninchen-IgG-HRP	1/10 000	Antikörperlösung 1

2.2.6. Antibiotika

Penicillin (10 000 U/ml) / Streptomycin (10 000 µg/ml)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2.7. Inhibitoren

Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor-Mix	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epoxomicin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lactacystin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor-Mix	Roche, Mannheim
SP600125 JNK-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, USA

2.2.8. Nachweissysteme

ECL™ Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, UK
<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidase-markierter Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antikörper (s. 2.2.5.) • Peroxidase-markierter Anti-Mausimmunglobulin-Antikörper (s. 2.2.5.) 	
Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent Kit	Bio-Rad, München
<ul style="list-style-type: none"> • Peroxidlösung • Luminol-Entwicklerlösung 	

2.2.9. Größenmarker

Größenmarker für SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus Proteinen bekannter Größen und ermöglichen die Abschätzung der Größe von Proteinen in der eigentlichen Probe. Als Proteinmolekulargewichtsmarker wurde der PageRuler™ PlusPrestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese bestehen aus DNA-Fragmenten bekannter Größe. Für DNA ab 1 000 bp wurde der Größenmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), für DNA zwischen 100 und 1 000 bp wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), verwendet.

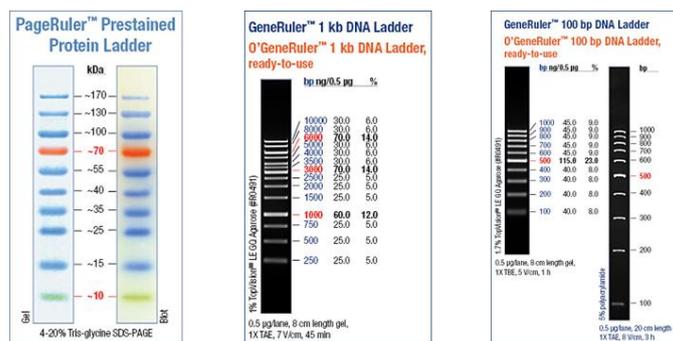


Abb. 2.1: Größenmarker für Western Blot und Agarosegelelektrophorese.

Quelle: http://www.fermentas.de/index.php?cPath=10_88

2.2.10. Medien und Seren

DMEM Medium GIBCO	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	GIBCO BRL, Karlsruhe
Pferdeserum	GIBCO BRL, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium GIBCO	Invitrogen, Karlsruhe
Select Agar	AppliChem, Darmstadt
Select Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Select Pepton	AppliChem, Darmstadt

2.3. Molekularbiologisches Material

2.3.1. DNA

2.3.1.1. Reportergenplasmide

Reportergenplasmide dienen dazu, mithilfe von Reportern (z. B. Luciferase oder GFP) die Aktivität eines Promotors darzustellen. Die Reportergensequenz wird 3' der Gensequenz des Promotors kloniert, der von eigentlichem Interesse ist. Damit steht die Expression des Reporters unter der Kontrolle des Promotors.

G5E1B-Luc

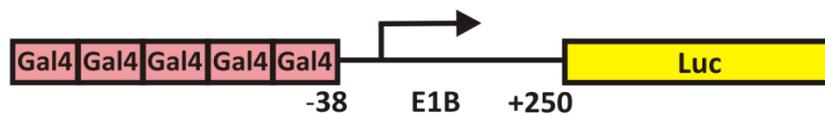


Abb. 2.2: G5E1B-Luc.

Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle von fünf Kopien der DNA-Bindungsstelle des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 und des minimalen adenoviralen E1B-Promotors (von -38 bis +250) (Krüger et al. 1997).

pGK-Luc



Abb. 2.3: pGK-Luc.

Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des β -Zell-Glucokinasepromotors der Ratte (-1003 bis +196) (Cha et al. 2001).

-336hInsLuc



Abb. 2.4: -336hInsLuc.

Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des humanen Insulingenpromotors (-336 bis +112) (Oetjen et al. 2003a).

Bcl-xL 1281**Abb. 2.5: Bcl-xL 1281.**

Luciferasereporter gen unter der Kontrolle des Bcl-xL-Promotors, kloniert in den pGL3 Vektor (Chen N et al. 2009).

pGFPtpz-CMV

Die Expression des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) steht unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors (Canberra Packard, Dreieich). Das Plasmid wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz cotransfiziert.

2.3.1.2. Expressionsplasmide

Plasmid	Herkunft	Referenz
pcDNA3/HA-MafA wt	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA S49A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA T53A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA T57A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA S61A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA S65A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)
pcDNA3/HA-MafA 4A	Wachtel	(Benkhelifa et al. 1998)

MafA der Spezies Wachtel wurde in den pcDNA3-Vektor kloniert und besitzt zwischen AS 1 und 2 ein HA1-Epitop (ein Oligonukleotid aus dem humanen Influenzavirus), welches an das N-terminale Ende von MafA gekoppelt ist. S49A, T53A, T57A, S61A und S65A sind Punktmutanten (z. B.: S49A Serin mutiert zu Alanin an Aminosäure 49). 4A ist eine Mutante, bei der die AS 49, 53, 57 und 61 mutiert sind.

pSG424-Gal4-MafA (1-233) Maus (Guo S et al. 2009)

Gal4 (1-147) Hefe (Sadowski und Ptashne 1989)

Maus-MafA (Aminosäure 1-233, erweiterte Transaktivierungsdomäne) wurde als Fusionsprotein mit dem Hefetranskriptionsfaktor Gal4 in den pSG424-Vektor (SV 40 Promotor) kloniert. Gal4 (1-147) ist die DNA-Bindungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4, welche zwar an DNA binden kann, jedoch aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne unfähig ist, selbst die Transkription zu aktivieren.

pCMV4-myc-MafA wt Maus (Guo S et al. 2009)

Maus-MafA wurde in den pCMV4-Vektor kloniert und ist N-terminal an ein myc-Epitop (9 AS) fusioniert. Dieses Konstrukt diente der Überexpression im Western Blot.

pHygEF2/HA-m-MafA wt Maus (Han et al. 2007)

pHygEF2/HA-m-MafA 4A Maus (Han et al. 2007)

pHygEF2/HA-m-MafA 5A Maus (Han et al. 2007)

pHygEF2/HA-m-DBD Maus (Han et al. 2007)

MafA der Spezies Maus wurde in den Vektor pHygEF2 kloniert und besitzt ein HA-Epitop. Die 4A Mutante hat Punktmutationen zu Alanin der AS 49, 53, 57 und 61; die 5A Mutante hat Punktmutationen der AS 49, 53, 57, 61 und 65.

pHygEF2/HA-m-DBD ist ein Konstrukt, welches kein MafA enthält und welches als Kontrolle dient (DBD - DNA-Bindungs-Domäne).

pHygEF2-GAL4-MafA wt Maus (Kataoka et al. 2002)

pHygEF2-GAL4-MafA 4A Maus (Kataoka et al. 2002)

pHygEF2-GAL4-MafA 5A Maus (Kataoka et al. 2002)

pHygEF2-GAL4-DBD Maus (Kataoka et al. 2002)

MafA der Spezies Maus wurde in den Vektor pHygEF2 kloniert und ist fusioniert mit dem Hefetranskriptionsfaktor Gal4. Bei der 4A Mutante sind die Aminosäuren 49, 53, 57 und 61 in Alanin mutiert; bei der 5A Mutante sind die Aminosäuren 49, 53, 57, 61 und 65 in Alanin mutiert. pHygEF2-Gal4-DBD ist ein Konstrukt, welches kein MafA enthält und als Kontrolle dient (s.o.).

pcDNA3.1-FLAG-DLK wt	Maus	(Holzman et al. 1994)
pcDNA3.1-FLAG-DLK K185A	Maus	(Mata et al. 1996)
pcDNA3.1-FLAG-DLK NLS1	Maus	(Wallbach 2010)
pcDNA3.1-FLAG-DLK NLS2	Maus	(Wallbach 2010)

Der Wild-Typ der DLK wurde in den pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen) kloniert, er steht unter Kontrolle eines CMV-Vektors. Ein zusätzliches N-terminales FLAG-Epitop aus 8 Aminosäuren wurde zwischen Aminosäure 1 und 2 eingefügt. Durch Punktmutation an Aminosäure 185 von Lysin zu Alanin entstand das Plasmid DLK K185A; es kann kein ATP mehr binden und ist katalytisch inaktiv. Die DLK-NLS-Mutanten (*nuclear localisation signal*), welche eine nukleäre DLK-Lokalisation verhindern, entstanden durch Punktmutationen der AS 186 und 188 (NLS1) und der AS 196, 199 und 200 (NLS2) in unserer Arbeitsgruppe (Wallbach 2010).

pAdTrack-CMV-DLK wt

pAdTrack-CMV-DLK K185A

pAd-DLK wt

pAd-DLK K185A

Die Plasmide pAdTrack-CMV DLK und pAd-DLK wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt (s. 2.5 und s. 2.5.2).

2.3.1.3. Leervektoren

Leervektoren sind Plasmide, die entweder dem DNA-Ausgleich oder als Negativkontrolle bei Transfektionen dienen oder als Ausgangsplasmid für die Klonierung eines gewünschten Gens fungieren können.

pBluescript	Stratagene La Jolla, USA
pAdTrack-CMV	Invitrogen, Karlsruhe
pAdEasy-1	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.1.4. Oligonukleotide

Oligonukleotide sind kurze DNA-Stränge, die aus wenigen Nukleotiden bestehen. Sie werden beispielsweise als Primer für die Sequenzierung von DNA verwendet. Primer dienen in der PCR als Startpunkt für DNA-Polymerasen. Für die Sequenzierung wurden die Oligonukleotide von Eurofins Operon (Ebersberg) bezogen.

Name	Richtung	Sequenz in 5'-3' Richtung	T _m (°C)
pAdTrack DLK	<i>forward</i>	GAA CTC GAG GAT GTT GGG GTG CT	63,0
pAdTrack DLK	<i>reverse</i>	GTG GGA GGT CTA TAT AAG CAG AGC	62,7

2.3.2. Bakterien

Der chemisch kompetente apathogene *Escherichia coli* Stamm DH5 α wurde für die Plasmid-Amplifikation (s. 2.4.4) genutzt.

Der elektrokompente *E.coli* Stamm DH10B wurde für die Amplifikation von pAd-DLK genutzt (s. 2.5.2).

Der elektrokompente *E.coli* Stamm BJ5183 (AdEasier-Zellen) enthielt das Plasmid pAdEasy-1 und wurde für die homologe Rekombination bei der Herstellung des rekombinanten Adenovirus-Plasmids genutzt (s. 2.5.2).

2.3.3. Adenoviren

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung der Plasmid-DNA zweier Adenoviren, welche die genetische Information für den DLK wt und die Mutante DLK K185A tragen (pAd-DLK wt und pAd-DLK K185A).

Überexpression mittels adenoviralen Gentransfers in Zellen geht mit einer wesentlich höheren Transfektionseffizienz einher als transiente Transfektionen von Plasmid-DNA. Adenovirale Überexpression eines Gens durch Infektion wird beispielsweise dann verwendet, wenn eine Primärkultur (z. B. primäre humane Pankreasinseln) nicht transient transfizierbar ist. Adenovirale Genexpression ist auch dann möglich, wenn sich die infizierten Zellen nicht teilen können (He et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Plasmid, welche für die Amplifikation der Adenoviren in HEK-293A-Zellen benötigt wird, erfolgreich hergestellt werden. Die Amplifikation bzw. Herstellung der Adenoviren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Kollegen übernommen. Die hergestellten Adenoviren sind humane Adenoviren vom Serotyp 5, und sie besitzen ein 36 kb großes doppelsträngiges Genom.

2.4. Methoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1. Sterilisation

Vor Gebrauch wurden alle hitzestabilen Lösungen und Materialien zur Inaktivierung von Proteasen, Nukleasen und Mikroorganismen für 20 min bei 120 °C und 10^5 Pa autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.4.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels UV-Spektralphotometer durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde in einem Mikroliter gegen reines H_2O bidest. als Leerwert gemessen.

$$c = E \times K \times d^{-1} \rightarrow c_{DNA} (\mu g/\mu l) = OD_{260} \times 50 \mu g/ml \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Abb. 2.6: Konzentrationsbestimmung von DNA.

Die Konzentrationsbestimmungen von DNA (c_{DNA}) leiten sich vom Lambert-Beerschen Gesetz her, wobei die Extinktion E der optischen Dichte bei 260 nm und die Proportionalitätskonstante K bei DNA 50 $\mu g/ml$ entspricht. Die Schichtdicke d entspricht jeweils 1 cm und kann rechnerisch vernachlässigt werden.

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) gibt eine Aussage über die Reinheit der Plasmid-DNA, es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

2.4.3. Herstellung antibiotikahaltiger LB-Agarplatten

LB-Medium		1 l
NaCl	1 % (w/v)	10 g
Pepton	1 % (w/v)	10 g
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	5 g
+ Antibiotikum	33 oder 50 mg/l	666 μl oder 1 ml der 5 % Stammlösung

LB-Agarplatten wurden mit LB-Medium und 1,5 % (w/v) Select Agar hergestellt. Die Lösung wurde für 20 min bei 120 °C und 10^5 Pa autoklaviert und danach auf ca. 60 °C abgekühlt. Das jeweilige Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) zur späteren Selektion wurde in der gewünschten Konzentration hinzugegeben und das noch flüssige Medium auf 10-cm-Platten verteilt. Die Platten wurden bei RT stehen gelassen, bis das Medium fest war. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

2.4.4. Herstellung chemisch kompetenter E.coli

Kompetenz bezeichnet die Eigenschaft von Zellen bzw. Bakterien, Fremd-DNA aufzunehmen. Es wurde mit elektrisch (s. 2.4.6) und chemisch kompetenten Bakterien gearbeitet. Die Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -E.coli-Bakterien erfolgte mittels der CaCl₂-Methode. Dazu wurden DH5 α -Bakterien mithilfe einer Pipettenspitze vorsichtig auf einer antibiotikafreien Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C aufgewachsen. Eine Kolonie wurde in einer Vorkultur mit 10 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 UpM im Schüttler bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 (s. 2.4.16) aufgewachsen. Diese Vorkultur wurde in eine Hauptkultur mit 100 ml gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 aufgewachsen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min bei RT und 3 000 UpM zentrifugiert (Sigma 3K30 Kühlzentrifuge) und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden vorsichtig in 50 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 3 000 UpM) wurde der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in eiskalter MgCl₂-Lösung mit 15 % Glycerin resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde rasch in 100 μ l Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Reaktions-Gefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4.5. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von DNA in prokaryontische Zellen. Chemisch kompetente E.coli-Bakterienzellen vom Stamm DH5 α sind bei -80 °C gelagert und wurden zur Transformation auf Eis aufgetaut. 100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA

wurden mit 30 µl Bakterienlösung vermischt und 30 min auf Eis verwahrt. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C, die Aufnahme der DNA wurde damit induziert. Danach wurde die Bakterienlösung für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml antibiotikafreies LB-Medium (s. 2.4.3) zu der Bakterienlösung gegeben, und die Suspension wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. LB-Agarplatten wurden vorgewärmt und die Bakterienlösung kurz anzenzentrifugiert. Nach Verwerfen von 800 µl des Überstandes wurden die Bakterien resuspendiert und 100 µl bis 200 µl mithilfe einer abgeflamnten und gebogenen Pasteurpipette auf der Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Aufgrund des antibiotikaresistenz-codierenden Genes des transformierten DNA-Plasmids wuchsen auf den antibiotikahaltigen LB-Agarplatten nur solche Bakterien heran, die das Plasmid aufgenommen haben. Einzelne Kolonien konnten zur weiteren Amplifikation vorsichtig von der Agarplatte genommen werden.

2.4.6. Elektroporation elektrokompetenter AdEasier-Zellen

SOB-Medium		1 l
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	5 g
Pepton	2 % (w/v)	20 g
NaCl	10 mM	0,5 g
MgCl ₂	1 M	10 ml
MgSO ₄	1 M	10 ml

Das Medium wurde zunächst ohne Mg²⁺ hergestellt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde 10 ml sterilfiltriertes MgCl₂ und 10 ml sterilfiltriertes MgSO₄ hinzugegeben.

SOC-Medium		100 ml
Glucose	0,4 M	4 ml Glucose-Stammlösung
SOB-Medium		ad 100 ml

Das SOC-Medium wurde jeweils frisch angesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

Die Elektroporation stellt neben der Transformation (prokaryontische Zellen), der Transfektion (eukaryontische Zellen) und viralem Gentransfer eine Methode dar, mit der Fremd-DNA in eine Zelle geschleust werden kann. Durch ein angelegtes elektrisches Feld wird die Zellmembran permeabel, sodass die DNA aufgenommen werden kann.

Zu jeweils 50 μl elektrokompetenter AdEasier-Zellen (auf Eis) wurden 250 ng des linearisierten, aufgereinigten pAdTrack-CMV-DLK-wt- und pAdTrack-CMV-DLK-K185A-Plasmids gegeben, durch Pipettieren gemischt und rasch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit Aluminiumelektrode (2 mm Breite) gegeben. Die Küvette wurde in den Elektroporator MicroPulser™ gestellt, und es wurde ein elektrisches Feld angelegt (2,5 kV, 200 Ω , 25 μF , 1 Puls, 5 ms). Sofort anschließend wurden 250 μl vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben, und die Bakterienlösung wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 20- bis 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien auf Kanamycin-Agarplatten (33 mg/l) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (analog s. 2.4.5).

Beim Aufwachsen der rekombinanten AdEasier-Zellen (s. 2.5.2) ergab sich folgende Besonderheit: Nach der Elektroporation wuchsen die Bakterienkolonien ca. 20 h im Brutschrank. Jene Bakterien, in denen die homologe Rekombination stattgefunden hat, wuchsen sehr langsam. Schneller hingegen wuchsen diejenigen Bakterien, die unlinearisierte pAdTrack-DLK aufgenommen und amplifiziert haben. Daher durften nur die kleinsten Klone weiter verwendet werden (s. Abb. 2.7). Die Klone wurden in 5 ml LB-Medium mit 33 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin aufgewachsen und nach 24 h Inkubation wurde eine Minipräparation (s. 2.4.15) vorgenommen.

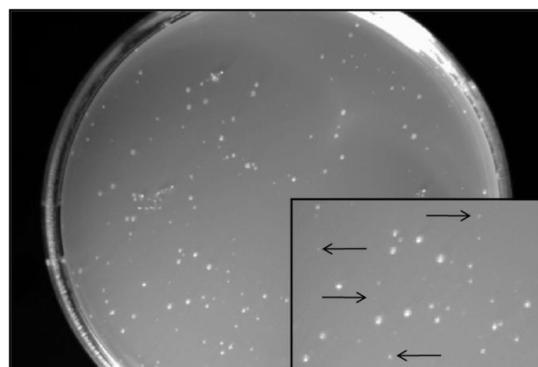


Abb. 2.7: Kanamycin-Agarplatte nach Elektroporation mit AdEasier-Zellen.

Beim Aufwachsen der Klone musste darauf geachtet werden, dass nur die kleinsten Klone (s. Pfeile) verwendet wurden.

2.4.7. Restriktionsenzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA in spezifische Fragmente spalten. Sie erkennen spezifische Basensequenzen, meist Palindrome, und schneiden beide Stränge durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen. Der Restriktionsverdau erfolgt mit mind. 2 Units Enzym pro 1 µg DNA in 10 x Puffer. Eine Unit ist die Enzymmenge, die bei 37 °C 1 µg DNA pro h umsetzt. Das Volumen des Enzymes durfte maximal 10 % des Gesamtvolumens betragen. Der gesamte Reaktionsansatz aus Enzym, DNA und Puffer wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach vollständigem Verdau wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.4.8) analysiert.

Typischer Restriktionsverdau		10 µl
DNA	2 µg	1 µl
Restriktionsenzym 1	5 U	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	5 U	0,5 µl
Puffer	10 x	1 µl
BSA	100 x	0,1 µl
H2O bidest.	ad 10 µl	6,9 µl

2.4.8. Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer		1 l
Tris	40 mM	4,84 g
EDTA	1 mM	2 ml von 0,5 M Stammlösung
Eisessig	20 mM	1,14 ml

Die horizontale Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, um linearisierte DNA-Fragmente anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufzutrennen. DNA besitzt eine

negative Gesamtladung und wandert im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Der prozentuale Anteil der Agarose (w/v) im Gel wurde anhand der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt. Für eine Fragmentgröße von 500 bis 10 000 bp wurde 0,8%iges Gel verwendet, für eine Fragmentgröße von 200 bis 3 000 bp wurde 1,5%iges Gel verwendet (Sambrook et al. 1989). Die Agarose wurde kurz in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, gelöst, und nach einer Abkühlung auf ca. 50 °C wurde 0,5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid pro 20 ml flüssigem Gel hinzugefügt. Das Gel wurde noch flüssig in Elektrophorese-Gießkammern gegossen, in welche ein Kamm eingespannt war, entsprechend der Anzahl der zu bestimmenden DNA-Proben. Das Gel polymerisierte bei RT. Für die Elektrophorese wurde das Gel inkl. Gießkammer in die Elektrophoresekammer platziert und mit ausreichend TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit Stopp Puffer (6 x DNA Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt, und dieser Mix wurde in die Geltaschen pipettiert. Pro Tasche wurden 12 µl pipettiert. Die horizontale Elektrophorese von der Kathode zu Anode wurde mittels eines konstanten elektrischen Feldes von 80 V erreicht. Die DNA migrierte entlang des elektrischen Feldes und wurde entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Ethidiumbromid interkalierte mit der DNA und erlaubte aufgrund seiner Fluoreszenz eine Sichtbarmachung der DNA-Fragmente. Diese wurden bei einer Wellenlänge von 254 oder 366 nm (UV-Licht) im GelDoc™ XR Molecular Imagers mit der Image Lab Software von Bio-Rad (München) dargestellt.

2.4.9. Aufreinigen von DNA aus Agarosegelen

Um fragmentierte DNA eines Plasmids aufzureinigen, musste dieses zunächst mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (s. 2.4.7) und auf ein Agarosegel (s. 2.4.8) aufgetragen werden. Die gewünschte DNA-Bande ließ sich unter Sichtkontrolle mit kurzwelligem UV-Licht mithilfe eines Skalpell aus dem Gel ausschneiden. Dabei sollte möglichst zügig gearbeitet werden, um UV-induzierte DNA-Schäden zu vermeiden. Anschließend wurde die Agarose mit Hilfe des Easy Pure® DNA Purification Kit nach Herstellerangaben zunächst mit dreifacher Menge an einer Salz-Lösung bei 55 °C gelöst. Silicamatrix wurde zu der DNA-Lösung gegeben, um die DNA zu binden. Anschließend wurde die Silicamatrix mit einer alkoholischen Lösung

gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl H₂O bidest. gelöst, die Silicamatrix abzentrifugiert, und die DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt.

2.4.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Das Verknüpfen linearisierter DNA-Fragmente nennt man Ligation. Dabei katalysiert das Enzym T4 DNA Ligase die Bildung einer Phosphodiesterase-Bindung zwischen den 5'-Phosphatresten und den 3'-Hydroxy-Enden in doppelsträngiger DNA.

$$\text{Menge}_{\text{Insert}} (\text{ng}) = \frac{\text{molares Verhältnis (Insert/Vektor)} \times \text{kb}_{\text{Insert}} \times \text{Menge}_{\text{Vektor}} (\text{ng})}{\text{kb}_{\text{Vektor}}}$$

Abb. 2.8: Berechnung von Insert- und Vektormenge anhand der Größe ihrer Fragmente.

Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug üblicherweise 4:1.

Der Ligationsansatz wurde in einem Eppendorf-Reaktions-Gefäß pipettiert, vorsichtig vermischt und über Nacht in einem Wasserbad bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz zur Transformation von chemisch kompetenten E.coli-Bakterien verwendet (s. 2.4.5).

Typischer Ligationsansatz		15 µl
Vektor DNA		2 µl
Insert DNA		8 µl
T4 DNA Ligase	1 U	1 µl
T4 Ligase Puffer	10 x	1,5 µl
H ₂ O bidest.		2,5 µl

2.4.11. Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten

Linearisierte Plasmide, deren Enden identische Restriktionsschnittstellen besitzen, haben eine hohe Religationsrate und müssen daher am 5'-Ende dephosphoryliert werden.

Das Plasmid pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ besaß in linearisierter Form am 5'- und 3'-Ende die Schnittstellen für *Xba*I und wurde daher mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) am 5'-Ende dephosphoryliert, sodass eine Religation verhindert werden konnte. Das mit dem Vektor pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ zu ligierende Fragment DLK₁₀₅₋₈₈₈ besaß am 5'-Ende den Phosphatrest noch und konnte in den Vektor ligiert werden. Für die Dephosphorylierung wurden 20 µl DNA-Lösung, 5 µl 10 x Reaktionspuffer der CIAP, 1 µl CIAP-Enzym und 24 µl H₂O bidest. in ein Eppendorf-Reaktions-Gefäß pipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch 15-minütiges Erhitzen bei 85 °C gestoppt. Eine erneute Aufreinigung mittels des Easy Pure[®] DNA Purification Kit (s.o.) schloss sich an.

2.4.12. Restriktionsenzymverdau der klonierten Plasmide

Um die einzelnen Bakterienkolonien einer Transformation nach der Minipräparation auf ihre Korrektheit zu überprüfen, wurden diese mit Restriktionsenzymen so verdaut, dass sich richtige und falsche Klone durch unterschiedliche Fragmentgröße darstellen ließen.

1) Bei der Klonierung der Plasmide pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A wurden die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Eco*RV gewählt. Es ließ sich einerseits die korrekte Ligation des Fragments DLK₁₋₁₀₄ in den pAdTrack-CMV-Vektor überprüfen (s. Abb. 2.9 A), sowie die richtige Orientierung des Fragments DLK₁₀₅₋₈₈₈ nach der Ligation in den Vektor pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ (s. Abb. 2.9 B). Dabei entsprechen die dargestellten Banden den erwarteten Fragmentgrößen.

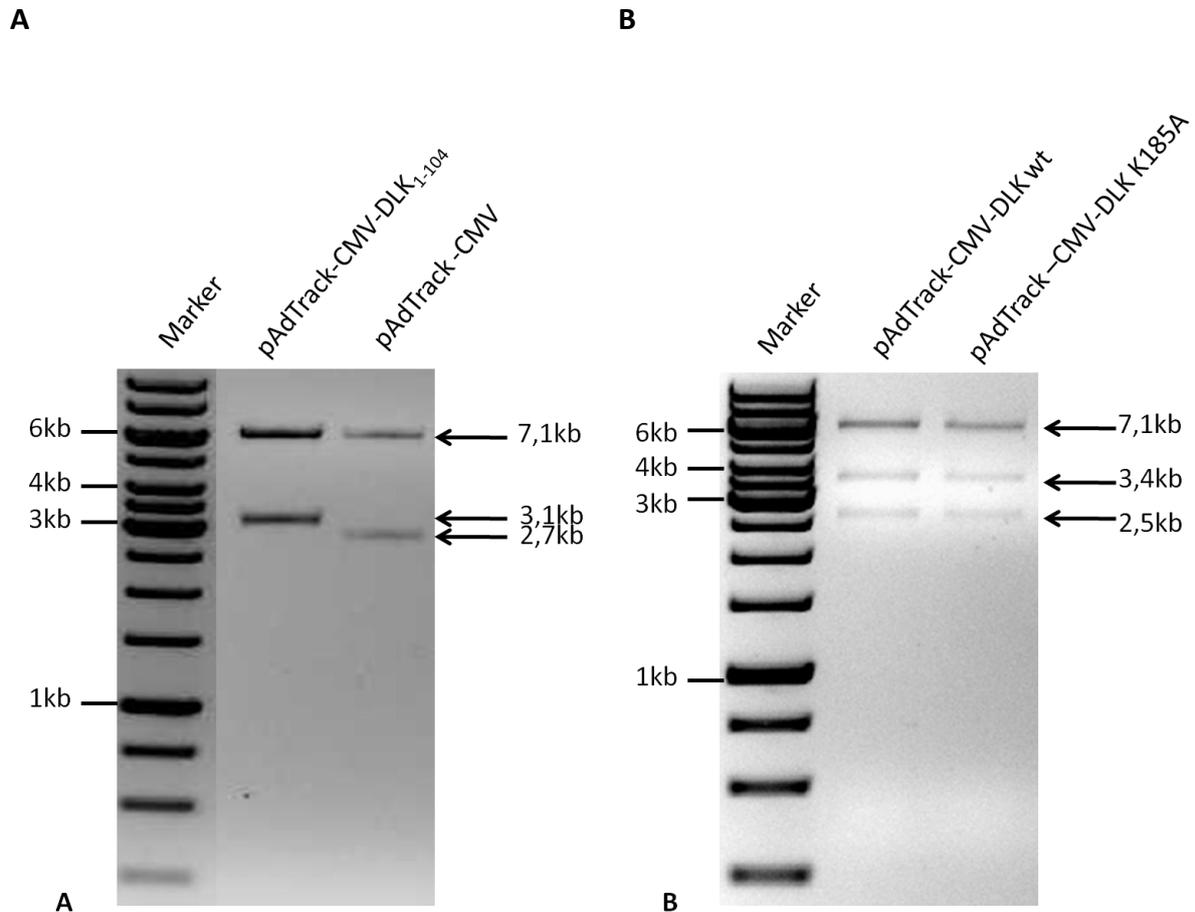


Abb. 2.9: Agarosegelelektrophorese der Klonierungsschritte von pAdTrack-CMV-DLK.

Nach Verdau mit *EcoRI* und *EcoRV*. **A:** Überprüfung der Ligation von DLK₁₋₁₀₄ in den pAdTrack-Vektor. **B:** Richtige Orientierung des Fragments DLK₁₀₅₋₈₈₈ nach der Ligation in den Vektor pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ (wt und K185A).

2) Bei der Generierung der rekombinanten Adenovirus-Plasmide wurde nach der Minipräparation kontrolliert, ob die amplifizierten Klone tatsächlich homolog rekombiniert waren. Dazu wurden zunächst alle Klone unlinearisiert auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Größe annähernd stimmte (0,8%iges Gel, alle größer als 10 kb galten zunächst als positiv).

Anschließend wurden alle geeigneten Klone mit dem Restriktionsenzym *PacI* verdaut. Bei positiven Klonen wanderten 2 Fragmente im Gel: Eines war sehr groß (>30 kb), und ein kleines migrierte bei 3 oder 4,5 kb (s. Abb. 2.10). Beide Möglichkeiten waren korrekt, da die homologe Rekombination zwischen den beiden homologen Armen und alternativ zwischen den *ori*-Regionen der beiden Plasmide stattfinden konnte.

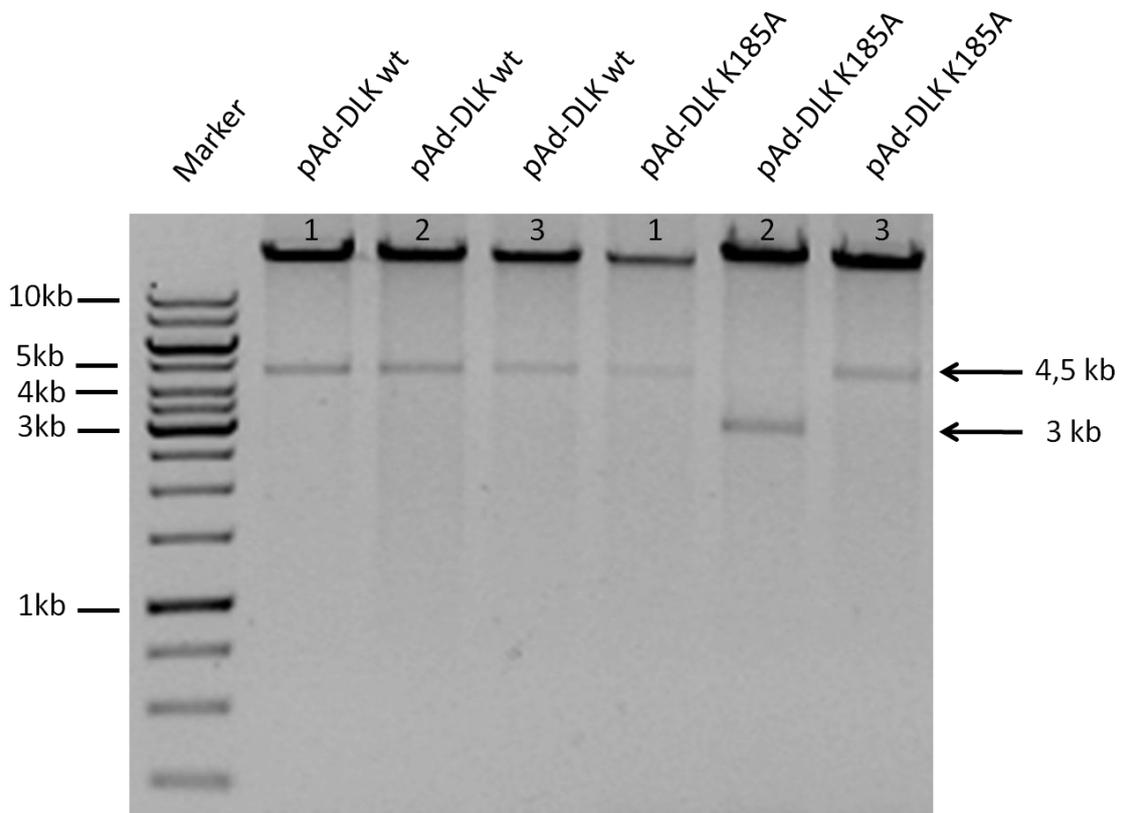


Abb. 2.10: Agarosegelelektrophorese nach der homologen Rekombination von pAd-DLK.

Je 3 Klone pAd-DLK wt und pAd-DLK K185A nach der Minipräparation wurden mit *PacI* verdaut. Alle 6 Klone waren positiv (>30 kb). 5 der Klone gaben ein 4,5 kb großes Fragment ab, ein Klon ein 3 kb großes Fragment.

Optional konnte mit einem weiteren Restriktionsenzym verdaut werden, um das Plasmid zusätzlich zu analysieren (z. B. *Bam*HI).

2.4.13. Phenol/Chloroform-Extraktion

Um DNA-Lösungen von Proteinen zu befreien, wird die Phenol/Chloroform-Extraktion verwendet (Colter et al. 1962; Sambrook et al. 1989). Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) versetzt, 30 sek kräftig geschüttelt und für 5 min bei RT und 12 000 UpM zentrifugiert. Dieser Vorgang wiederholte sich ein weiteres Mal. Die sich im Überstand befindliche DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert (s.u.).

2.4.14. Ethanolpräzipitation

Die Präzipitation von DNA (Sambrook et al. 1989) erfolgte durch Zugabe des doppelten Volumens eiskalten absoluten Ethanols und 10 % (v/v) 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) (s. 2.4.5.4.). Die Lösung wurde vermischt und für 30 min bei -20 °C gelagert. Durch die anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 UpM konnte die präzipitierte DNA sedimentiert werden. Das Sediment wurde zur Salzentfernung mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen, für 5 min bei 4 °C und 14 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschvorgang wiederholte sich zweimal. Das DNA-haltige Sediment wurde getrocknet und im gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

2.4.15. Minipräparation von Plasmid-DNA

Puffer M1		100 ml
Tris (pH 8,0)	25 mM	2,5 ml von 1 M Stammlösung
Glucose	50 mM	10 ml von 0,5 M Stammlösung
EDTA (pH 8,0)	10 mM	2 ml von 0,5 M Stammlösung
<i>Frisch dazu gegeben wurde:</i>		
Lysozym		2 mg/1 ml Puffer M1.
Puffer M2		5 ml
NaOH	0,2 N	1 ml von 1 N Stammlösung
SDS	1 % (w/v)	500 µl von 10 % Stammlösung
Puffer M3		20 ml
Na-Acetat (pH 4,8)	3 M	8,165 g

Alle Puffer wurden bei RT gelagert.

Das Verfahren der Minipräparation wird angewendet, um nach der Klonierung von Plasmid-DNA die Korrektheit zu überprüfen. Nach der Minipräparation erhält man ca. 20 µg DNA pro Konstrukt. Es wurden 10-24 Einzelkolonien einer Transformation (s. 2.4.5) von der Agarplatte in je 4 ml LB-Antibiotika-Medium (s. 2.4.3) in einem 15-ml-Röhrchen angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 UpM im Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurde für 5 min bei 4 °C und 6 000 UpM zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 150 µl Puffer M1 aufgenommen und 10 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden rasch 200 µl Puffer M2 hinzugegeben, um die Zellen alkalisch zu lysieren. Die Suspension wurde mehrmals geschwenkt und genau 5 min auf Eis inkubiert. 150 µl Puffer M3 wurden hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert, um das Lysat zu neutralisieren. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 14 000 UpM zentrifugiert. Die DNA-haltige obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt, und es erfolgte die DNA-Extraktion. Dazu wurden 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zu der Lösung gegeben und 30 sek kräftig geschüttelt. Anschließend wurde für 5 min bei RT und 12 000 UpM zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt, und es folgte die Ethanol-Präzipitation. Hierfür wurden zu der DNA-haltigen Lösung 1/10 Volumen Puffer M3 sowie das doppelte Volumen an 99%igem eiskalten Ethanol hinzugegeben und 30 min bei -20 °C gelagert. Anschließend für 30 min bei 4 °C und 14 000 UpM zentrifugiert, um die DNA zu sedimentieren. Das Pellet wurde in 500 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen. Das erhaltene DNA-Sediment wurde vollständig getrocknet und anschließend in 20 µl RNaseA aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die aus der Minipräparation erhaltene DNA wurde bei 4 °C gelagert und mit Restriktionsenzymverdau (s. 2.4.7) und Agarosegelelektrophorese (s. 2.4.8) überprüft.

TE-Puffer		1 l
Tris (pH 8,0)	10 ml	10 ml von 1 M Stammlösung
EDTA (pH 8,0)	1 mM	2 ml von 0,5 M Stammlösung

Chloramphenicol- und Lysozym-Lösung wurden frisch hergestellt, alle anderen Lösungen wurden bei RT gelagert.

Um große Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu isolieren, wird das nach Sambrook et al. (1989) modifizierte Verfahren der Maxipräparation verwendet. Dazu wird die Plasmid-DNA mithilfe von kompetenten E.coli Bakterien vermehrt und in einer CsCl-Dichtezentrifugation aufgereinigt. Zuerst wurde eine Vorkultur angelegt, indem eine Einzelkolonie einer Transformation (s. 2.4.5) inokuliert und in 15 ml LB-Antibiotika-Medium (s. 2.4.3) angeimpft wurde. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 UpM im Schüttler inkubiert. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden der Bakteriensuspension am nächsten Tag 850 µl entnommen, mit 150 µl Glycerin versetzt und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C als Bakterien-Stock eingefroren. Die verbleibende Vorkultur wurde zur weiteren Vermehrung der Bakterien in einen Erlenmeyerkolben mit 1 l LB-Antibiotika-Medium gegeben. Während der erneuten Inkubation dieser Hauptkultur erfolgten regelmäßige Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) im UV-Spektralphotometer (UV-160, Shimadzu), wobei jeweils reines LB-Medium als Leerwert verwendet wurde. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,8 wurde das Bakterienwachstum durch Zugabe von 5 ml Chloramphenicol-Lösung (Endkonzentration 200 mg/l) gestoppt. Chloramphenicol wirkt bakterio-statisch, indem es die Proteinbiosynthese der Bakterien hemmt, die Synthese von Plasmid-DNA wird jedoch nicht gehemmt. Die Kultur wurde anschließend eine weitere Nacht bei 37 °C und 200 UpM im Schüttler inkubiert. Zur Aufarbeitung wurde sie am nächsten Tag in 4 250-ml-Zentrifugengefäße aliquotiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 10 000 UpM in einem vorgekühlten Rotor zentrifugiert (Beckman JA-14-Rotor, J2-HS-Zentrifuge). Der Überstand wurde abgossen und die Bakterienzellsuspension in 11,25 ml eiskalter STE-Lösung resuspendiert. Der Inhalt zweier 250-ml-Zentrifugengefäße wurde in einem 50-ml-Zentrifugengefäß vereinigt. Diese 22,5 ml Zellsuspension wurde mit 1,5 ml frisch angesetzter

Lysozym-Lösung versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Zur Zelllyse erfolgte die Zugabe von 14,4 ml Triton-Mix. Die Proben wurden während der folgenden 30-minütigen Inkubation auf Eis regelmäßig alle 5 min geschwenkt. Zur Sedimentation der Zelltrümmer wurden die Proben erneut in einem vorgekühlten Rotor (Beckman JA-20-Rotor) zentrifugiert (60 min, 4 °C, 16 000 UpM). Die DNA-haltigen Überstände zweier 50-ml-Zentrifugengefäße wurden anschließend in einem 250-ml-Zentrifugengefäß vereinigt. Durch die Zugabe von 40 ml eiskalter PEG-Lösung und 60-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA präzipitiert und mit der sich anschließenden Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10 000 UpM, Beckman JA-14-Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das DNA-haltige Sediment getrocknet und in 10 ml TNE-Lösung resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 10,9 g Cäsiumchlorid und 150 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Die Proben wurden nun luftblasenfrei mithilfe einer 5-ml-Einmalspritze sowie einer 20-G-Kanüle in 10-ml-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, welche nach Austarierung mit einer Analysenwaage auf eine maximale Gewichtsabweichung von 0,05 g zugeschweißt wurden. Während der sich anschließenden Ultrazentrifugation (20 h, 20 °C, 60 000 UpM; Beckman, 70,1-Ti-Rotor, Ultrazentrifuge L5-65, Krefeld) baute sich ein Dichtegradient auf, welcher die Darstellung der zirkulären Plasmid-DNA als distinkte ethidiumbromidgefärbte Bande erlaubte. Diese Bande wurde vorsichtig mit einer 5-ml-Einmalspritze und 20-G-Kanüle abgezogen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, wurde die visköse DNA-Lösung mit gleichem Volumen Isoamylalkohol versetzt, kräftig geschüttelt und kurz bei 1 300 UpM zentrifugiert. Das Ethidiumbromid trat zum größten Teil in die obere organische Phase über, welche sodann abgesaugt und erneut durch Isoamylalkohol ersetzt wurde. Der ganze Vorgang wurde so oft wiederholt, bis beide Phasen völlig farblos waren. Um das Cäsiumchlorid zu entfernen, folgte eine Dialyse der unteren DNA-haltigen Phase. Dazu wurde die DNA in einen mit H₂O bidest. gespülten Dialysierschlauch gegeben und zweimal 12 h gegen 1 l TE-Puffer bei 4 °C rührend dialysiert. Zur weiteren Untersuchung der gewonnenen Plasmid-DNA schloss sich eine photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (s. 2.4.2), eine restriktionsenzymatische Spaltung (s. 2.4.7) sowie eine Agarosegelelektrophorese an (s. 2.4.8).

2.4.17. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Banks Mullis erfunden und dient der Amplifikation von DNA *in vitro*. Benötigt werden die *template* DNA, *Pfu* DNA Polymerase mit Puffer, dNTPs und *forward/reverse* Primer. Es werden spezifische Primer verwendet, die die zu amplifizierende *template* DNA-Sequenz flankieren (s. 2.3.1.4).

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung / Schmelzen der *template* DNA
- Primer-Hybridisierung / *Annealing*
- Elongation / Amplifikation / Verlängerung.

Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei Erhitzen auf 96-98 °C durch Auftrennen der Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert. Die Anlagerung des Primers an die jeweilige DNA-Sequenz geschieht bei der Hybridisierungs-Temperatur. Bei 72 °C wird die DNA durch die hitzestabile *Pfu* DNA Polymerase amplifiziert, welche die DNA, beginnend beim jeweiligen Primer, in 5'-3' Richtung mit freien Nukleotiden (dNTPs) auffüllt. Der Zyklus wird insgesamt 35-mal wiederholt. Die neu synthetisierte DNA dient nun ebenfalls als *template*; dadurch steigt die DNA-Menge exponentiell. Nach Beendigung werden die Proben auf 4 °C gekühlt. Die amplifizierte DNA wird anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.4.8) auf die Größe und Menge der amplifizierten DNA kontrolliert, ausgeschnitten (s. 2.4.9) und für die Sequenzierung verwendet.

APCR-Ansatz

<i>template</i> DNA	1 ng
<i>forward</i> Primer	30 pmol
<i>reverse</i> Primer	30 pmol
dNTPs	200 μ M
Polymerase-Puffer 10 x	1x
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1 U
H ₂ O	ad 50 μ l

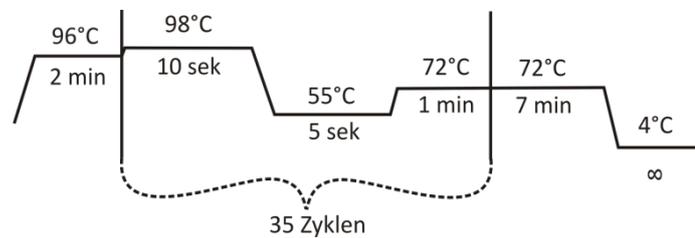
B

Abb. 2.11: PCR A: Ansatz. B: Einstellungen für den Thermo Cycler.

2.4.18. Sequenzierung von DNA

Zum Nachweis der Korrektheit von Nukleotidsequenzen doppelsträngiger DNA-Abschnitte wurde das Verfahren der Sequenzierung verwendet, welches auch als Didesoxymethode oder Kettenabbruchsynthese bezeichnet wird (Sanger et al. 1977). Dazu wurde das Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet, welches normale dNTPs, die *Taq*-Polymerase und Fluoreszenz-gekoppelte ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP) enthielt. Die Didesoxymethode beruht darauf, dass DNA-Stränge mithilfe der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung neu gebildet werden. Diese Neubildung beginnt am Primer der zu sequenzierenden DNA und wird, sobald anstelle von normalen dNTPs nun Didesoxynukleotide (ddNTPs) (denen am 3'-Ende die Hydroxygruppe fehlt) eingefügt werden, abgebrochen. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Fragmente. Die dNTPs werden mit den ddNTPs so vermischt, dass statistisch alle Größen an DNA Fragmenten entstehen können. Fragmente gleicher Länge enden mit identischen fluoreszenzgekoppelten ddNTPs und emittieren das gleiche Fluoreszenzsignal. Im Gegensatz zur PCR wird für die Sequenzierung

nur ein Primer pro Probe verwendet. Als *template* diente die aufgereinigte DNA aus der PCR (s.o.), das Ergebnis der Sequenzierung findet sich in Kap. 3.6.2, S.102.

Der Ansatz und die Reaktionsbedingungen der Sequenzierungs-PCR lassen sich Abb. 2.12 entnehmen.

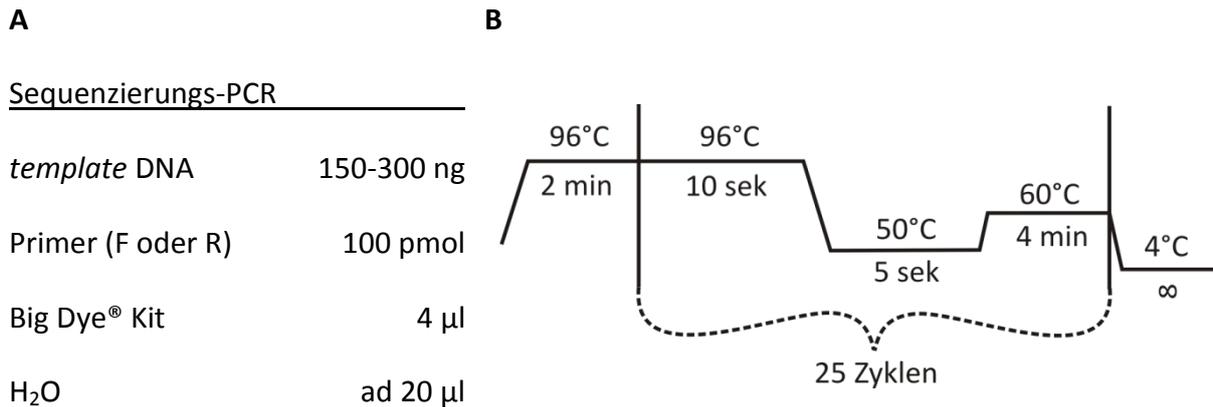


Abb. 2.12: Sequenzierungs-PCR A: PCR-Ansatz. B: Einstellungen für den Thermo Cycler.

Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurde der Sequenzieransatz mit einer Ethanolpräzipitation gereinigt. Dazu wurde zu den 20 µl Sequenzieransatz 2 µl Puffer M3 (0,1 x) (s. 2.4.15) sowie 50 µl eiskalter 99%iger Ethanol (2,5 x) gegeben. Die Probe wurde vorsichtig schnippend vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 UpM. Das DNA-haltige Sediment wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol analog zu Kapitel 2.4.14 gewaschen. Das Sediment wurde anschließend in 40 µl H₂O aufgenommen, in die Sequenzierplatte pipettiert und in den ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Abteilung Klinische Pharmakologie) platziert. Die Sequenzierung wurde gestartet. Dabei wurden die DNA-Fragmente über ein Gelkapillarsystem elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die vier Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die je an ein bestimmtes Nukleotid gekoppelt waren, wurden durch einen Laser angeregt. Die Fluoreszenzsignale konnten durch ein Detektorsystem des Sequenzers (ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System) aufgrund ihrer unterschiedlichen emittierten Wellenlängen quantifiziert werden. Die Auswertung der Basenabfolgen erfolgte mithilfe der Software Gap4 und Pregap 4.

2.5. Klonierung von pAd-DLK-Plasmiden

2.5.1. Herstellung der Plasmide pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A

Der Ausgangsvektor von DLK wt und DLK K185A ist pcDNA3.1, welcher die codierende Sequenz zwischen den Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* von *HindIII* und *XbaI* enthält (Holzman et al. 1994; Mata et al. 1996) (s. Abb. 2.13 A). Innerhalb der DLK gibt es eine weitere Schnittstelle für *XbaI*. Die pcDNA3.1-DLK-wt- und pcDNA3.1-DLK-K185A-Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut, die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt. Es ließen sich drei Fragmente darstellen: Der Vektor (5,4 kb), ein großes Fragment von 2363 bp (DLK₁₀₅₋₈₈₈, *XbaI/XbaI*) und ein kleines Fragment von 312 bp (DLK₁₋₁₀₄, *HindIII/XbaI*). Die beiden linearisierten Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt.

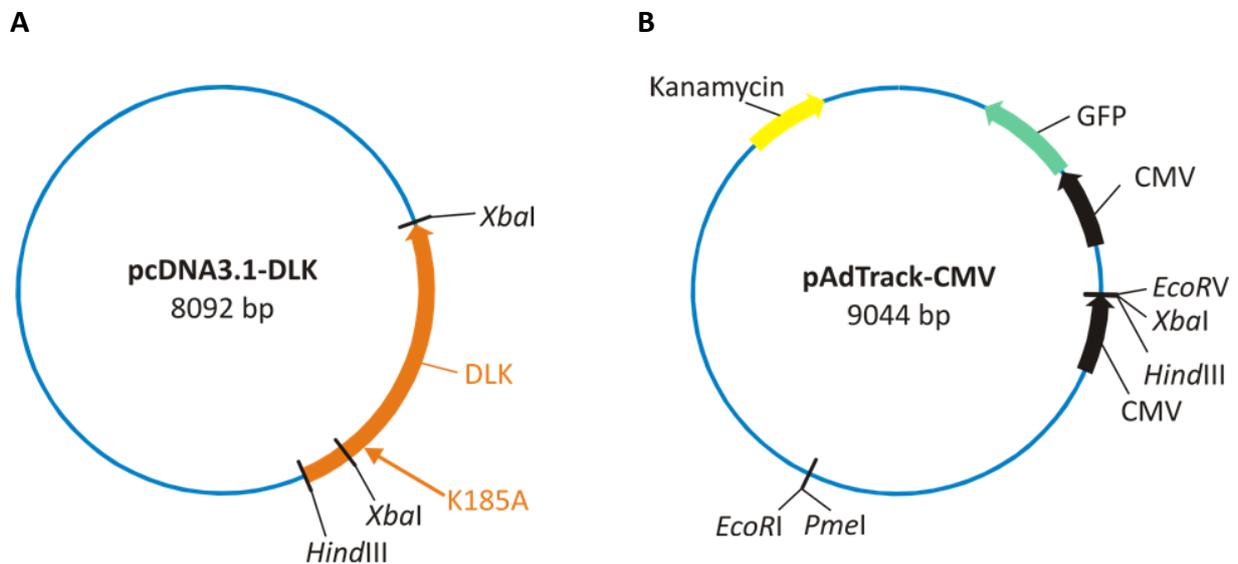


Abb. 2.13: Vektorkarten der Klonierung. A: Ausgangsvektor. B: Zielvektor.

Der Zielvektor pAdTrack-CMV enthält in seiner *multiple cloning site* ebenfalls Schnittstellen von *HindIII* und *XbaI*, in die die DLK kloniert wurde (s. Abb. 2.13 B). Dazu wurde zunächst der pAdTrack-CMV-Vektor mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut, auf ein Aga-

rosegel aufgetragen und aufgereinigt. Anschließend wurde der *HindIII/XbaI*-linearisierte pAdTrack-CMV-Vektor mit dem *HindIII/XbaI*-linearisierten Fragment DLK₁₋₁₀₄ ligiert, transformiert, auf Kanamycin-Agarplatten selektiert und schließlich mithilfe einer Minipräparation amplifiziert. Das neue Plasmid pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ wurde zur Kontrolle mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *EcoRV* verdaut und die entstandenen Fragmente im Agarosegel getrennt. Als Kontrolle diente der pAdTrack-CMV-Vektor. Positive Klone der Minipräparation stellten sich in zwei Fragmenten dar (s. Abb. 2.9 A). Das Plasmid pAdTrack-CMV-DLK₁₋₁₀₄ wurde mithilfe des Restriktionsenzym *XbaI* vollständig verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt. Um eine Religation zu verhindern, wurde das linearisierte Fragment dephosphoryliert und erneut aufgereinigt. Anschließend konnte es mit dem *XbaI/XbaI*-Fragment DLK₁₀₅₋₈₈₈ ligiert werden, und zwar einerseits mit dem des Wildtypes und andererseits dem der Mutante K185A. Nach der Ligation bei beiden Konstrukten erfolgte die Transformation, Selektion und Minipräparation. Das neu entstandene Plasmid pAdTrack-CMV-DLK₁₋₈₈₈ (im Folgenden pAdTrack-CMV-DLK genannt) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *EcoRV* asymmetrisch verdaut, um zu untersuchen, ob das Fragment *XbaI/XbaI* DLK₁₀₅₋₈₈₈ in der richtigen Orientierung in den Vektor kloniert wurde (gegen den Uhrzeigersinn 5'-3') (s. Abb. 2.9 B). Von den positiven Klonen des DLK-Wildtypes (pAdTrack-CMV-DLK wt) und der Mutante K185A (pAdTrack-CMV-DLK K185A) wurde je einer ausgewählt und amplifiziert. Abb. 2.14 zeigt den klonierten Vektor.

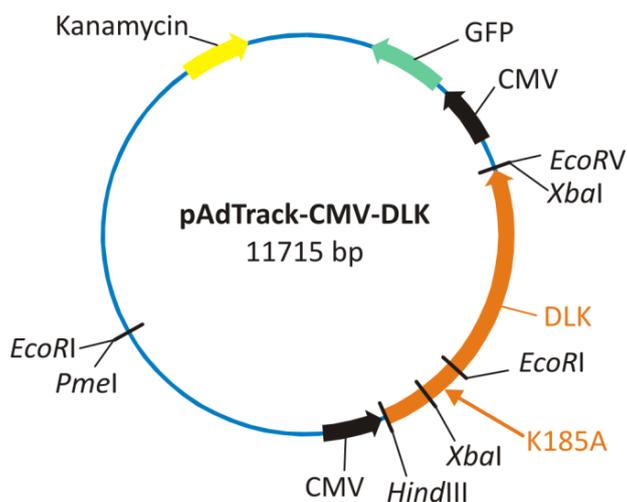


Abb. 2.14: Klonierter pAdTrack-CMV-DLK Vektor.

2.5.2. Generierung der rekombinanten DLK wt- und DLK K185A-Adenovirus-Plasmide mithilfe von AdEasier-Zellen

Unter Rekombination versteht man die Neuordnung von DNA. Dabei werden zwei Genabschnitte gegeneinander ausgetauscht. Bei der homologen Rekombination sind die Genabschnitte in ihrer Nukleotidsequenz nahezu identisch (sog. homologe Arme), s. Abb. 2.15. In der Gentechnik wird dies zum Beispiel genutzt, um zelleigene Gene durch Kopien zu ersetzen, die zusätzlich eine Mutation, eine Resistenz oder eine für ein anderes Protein codierende Sequenz enthalten. Dabei kann eine Gensequenz (hier: für DLK codierend) eines in eine Bakterienzelle (hier: AdEasier-Zelle mit pAd-Easy-1-Plasmid) eingefügten Vektors (hier: pAdTrack-CMV-DLK) in das Bakterienplasmid aufgenommen werden.



Abb. 2.15: Homologe Rekombination zwischen pAdTrack-CMV-DLK und pAdEasy-1.

Die Genabschnitte, die in ihrer Nukleotidsequenz gleich und untereinander ausgetauscht werden, sind grün markiert (rechter bzw. linker Arm). Dabei wird die DLK in das Zielplasmid integriert (pAd-DLK).

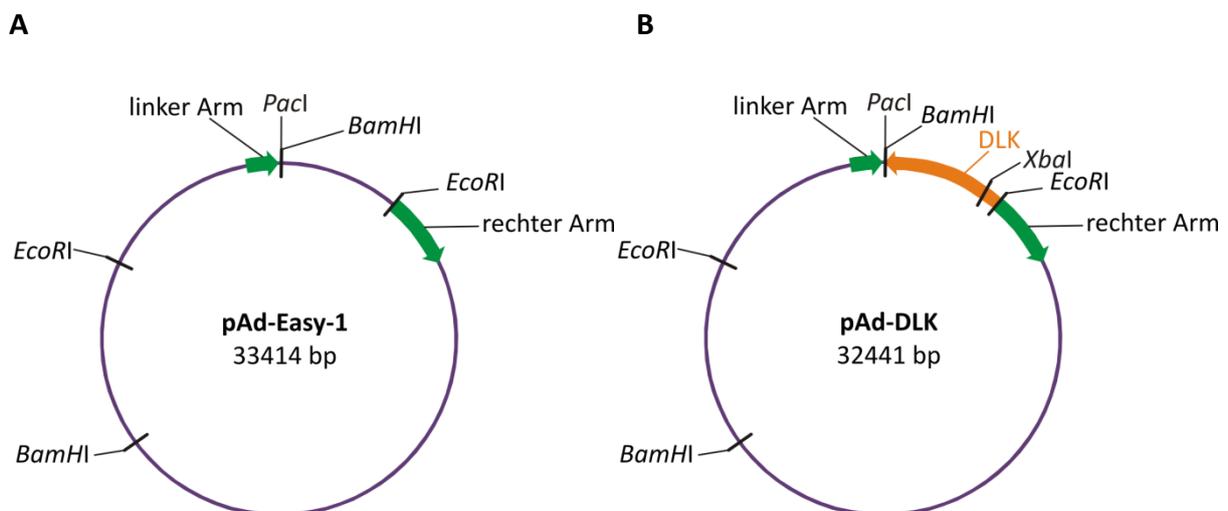


Abb. 2.16: Vektorkarten der homologen Rekombination. A: pAd-Easy-1. B: pAd-DLK.

Das Ziel der homologen Rekombination zwischen pAdTrack-CMV-DLK und pAdEasy-1 mit dem Ergebnis der rekombinanten DLK-wt- und DLK-K185A-Adenovirus-Plasmide ist in Kapitel 3.6 (S.101) beschrieben.

Nach der Herstellung von pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A wurden je 10 µg jedes Konstrukts mit dem Restriktionsenzym *PmeI* über Nacht in einem Ansatz mit 100 U Enzym und 100 µl verdaut. Um zu überprüfen, ob eine komplette Linearisierung stattgefunden hat, wurden 5 µl auf einem Agarosegel kontrolliert. Anschließend wurde die linearisierte DNA aufgereinigt. Dazu wurden zunächst 100 µl H₂O bidest., 100 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) (s. 2.4.15) und 4 µl Glykogen (10 mg/ml) zur besseren Präzipitation der DNA hinzugegeben. Es folgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.4.13) und eine Ethanolpräzipitation (s. 2.4.14), und die gereinigte, linearisierte DNA wurde in 30 µl H₂O bidest. aufgenommen. Anschließend wurden 100 ng für die Elektroporation in AdEasier-Bakterien verwendet (s. 2.4.6). Von den Bakterienkolonien wurden einzelne für eine Minipräparation verwendet (s. Abb. 2.7), die DNA kontrolliert, mit *PacI* verdaut (s. 2.4.12), und alle positiven pAd-DLK-Plasmid-Klone wurden schließlich in DH10B-kompetente Bakterien transformiert und mithilfe einer Maxi-Präparation (s. 2.4.16) amplifiziert, um genügend hochreine DNA für die Amplifikation des Virus zu erhalten (s. 3.6.1).

Damit war die Generierung der rekombinanten DLK-Adenovirus-Plasmide pAd-DLK wt und pAd-DLK K185A abgeschlossen.

2.6. Methoden für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen

2.6.1. Zelllinien

Als Zelllinie bezeichnet man immortalisierte Zellen eines Gewebes, welche sich (nahezu) unbegrenzt außerhalb des Ursprungsorganismus vermehren lassen.

Die Hamster Insulinoma Tumorzelllinie, Klon HIT-T15, ist eine insulinproduzierende, elektrisch erregbare pankreatische β -Zelllinie, die mit einer Simian Virus 40 (SV-40) Transformation von pankreatischen Inselzellen des Syrischen Hamsters hergestellt wurde (Santerre et al. 1981). HIT-T15-Zellen wurden für transiente Transfektionen genutzt.

JEG-3-Chorionkarzinom-Tumorzellen (Kohler et al. 1971) sind hormonproduzierende Zellen, die sich als Nicht- β -Zellen eignen, um Effekte unabhängig von β -Zell-endogenem Protein darzustellen. Sie wurden ebenfalls für transiente Transfektionen genutzt.

HEK-293A-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen; sie beinhalten die E1A und E1B Region des adenoviralen Genoms. Sie eignen sich zum Nachweis von überexprimierter pAdTrack-CMV-DLK (s. 2.4.6.8.) und dienen als Verpackungszellen für E1-deletierte pAd-DLK-Vektoren der Herstellung des Adenovirus innerhalb der Arbeitsgruppe (s. 3.6.1, S.101).

2.6.2. Medien und Puffer

PBS	1x	1 l
NaCl	140 mM	8 g
KCl	2,5 mM	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	1,44 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,24 g

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

RPMI-Komplettmedium		500 ml
RPMI-Medium		420 ml
Fötale Kälberserum	10 % (v/v)	50 ml
Pferdeserum	5 % (v/v)	25 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	5 ml
DMEM-Komplettmedium		500 ml
DMEM-Medium		445 ml
Fötale Kälberserum	10 % (v/v)	50 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	5 ml
Inkomplettes Medium		500 ml
DMEM-Medium		495 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	5 ml

Die Medien wurden alle bei 4 °C gelagert, PBS wurde bei RT gelagert.

2.6.3. Zellkultivierung

Der Umgang mit den Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Lösungen wurden vor ihrem Verbrauch autoklaviert oder sterilfiltriert. Vor dem Arbeiten unter der sterilen Werkbank wurden alle benötigten Materialien mit 70%igem Isopropanol abgewischt. Auch die behandschuhten Hände wurden sorgfältig desinfiziert. Für die Kultur der Zellen wurden Falcon™-Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 15 cm und 30 ml Kulturmedium oder 10 cm und 10 ml Kulturmedium, für Transfektionen wurden Falcon™-Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm und 5 ml Kulturmedium oder 6-well-Platten mit einem Durchmesser von 2,5 cm und 3 ml Kulturmedium verwendet. HIT-T15-

Zellen, JEG-Zellen und HEK-293A-Zellen wuchsen adhären auf dem Boden der Zellkulturschalen als Monolayer. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95%iger Luftfeuchtigkeit und unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig mit einem Mikroskop kontrolliert (Inverses Mikroskop TMS-F). Als HIT-T15-Zellkulturmedium diente komplettes RPMI-Medium, als JEG- und HEK-293A-Zellkulturmedium diente komplettes DMEM-Medium (s. 2.6.2). HIT-T15-Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:4 gesplittet (s.u.), jeweils 3-4 Tage nach dem Splitten erfolgte ein Mediumwechsel (s. 2.6.5). JEG-Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:7 bis 1:8 gesplittet. HEK-293A-Zellen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach der METAFECTENE™-Methode (s. 2.6.7) oder nach der Lipofectamine™ 2000-Methode (s. 2.6.8).

2.6.4. Splitten der Zellen

Als Splitten wird das Aufteilen der Zellen einer konfluent bewachsenen Zellschale auf mehrere neue Schalen bezeichnet. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums erfolgte ein Waschschrift mit PBS (s. 2.6.2). Dazu wurde 10-12 ml PBS an den Rand der Zellkulturschale pipettiert, die Schale vorsichtig geschwenkt und der Überstand mit toten Zellbestandteilen sowie Mediumresten abgesaugt. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen 3-4 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für ca. 3 min in den Inkubator gestellt. Das Ablösen der adhären Zellen wurde durch anschließendes Beklopfen der Schale unterstützt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium inaktiviert, und alle noch haftenden Zellen wurden von der Zellkulturschale gewaschen und in ein steriles 50-ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei RT und 1 300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment vorsichtig in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei RT und 1 300 UpM wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellsediment erneut in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in so viel Kulturmedium aufgenommen, dass der Zellanteil pro neuer Zellkulturschale in 5 ml gelöst war. Der Zellanteil wurde auf die neue Zell-

kulturschale, auf der bereits 25 ml frisches Medium vorgelegt war, gegeben, und die Zellen wurden solange im Brutschrank inkubiert, bis sie erneut geteilt werden mussten oder für Transfektionen verwendet wurden.

2.6.5. Mediumwechsel

Der Wechsel des Mediums erfolgte abhängig vom Phänotyp der Zellen, ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und ihrer Dichte. Das verbrauchte Medium wurde von der Zellkulturschale gesaugt und anschließend durch 30 ml frisches Kulturmedium ersetzt, indem es vorsichtig an den Rand pipettiert wurde.

2.6.6. Langzeitverwahrung und Rekultivierung der Zellen

Die Langzeitaufbewahrung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Von jeder Zelllinie wurde nach kurzer Passagezeit ein Teil wieder eingefroren. Zur Vorbereitung der Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen von einer konfluent bewachsenen 15-cm-Zellkulturschale entsprechend der Vorgehensweise beim Splitten mit 3 ml Trypsin abgelöst und in 12 ml Kulturmedium gewaschen. Das Zellsediment wurde in 4,5 ml Kulturmedium resuspendiert und zum Zellschutz vor Eiskristallen mit 0,5 ml sterilem DMSO versetzt, sodass eine Endkonzentration von 10 % (v/v) vorlag. Jeweils 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden in sterile Einfrierröhrchen aliquotiert, sofort auf Eis gestellt und bei -20 °C eingefroren und nach einem Tag bei -80 °C gelagert. Nach zwei Wochen wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und konnten dort nahezu unbegrenzt gelagert werden.

Das Auftauen der Zellen zur Revitalisierung erfolgte sehr rasch, um toxische Effekte des DMSO zu vermeiden. Die Zellen wurden dazu in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut, sofort in ein steriles 50-ml-Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und 2 min bei RT und $1\ 300\text{ UpM}$ zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden diese in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und auf einer 10-cm-Zellkulturschale ausplattiert. Nach mehrtägiger Inkubation wurde die Zellen gesplittet (s. 2.6.4).

2.6.7. Transfektion von Plasmid-DNA nach der METAFECTENE™-Methode

Eine Transfektion ist das Einbringen von Plasmid-DNA in eine eukaryontische Zelle. Transient bedeutet, dass die Plasmid-DNA nicht dauerhaft in das Genom der Zelle integriert wird, sondern nur kurzzeitig in die Zelle aufgenommen wird.

Transiente Transfektionen nach der METAFECTENE™-Methode wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. METAFECTENE™ ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Es komplexiert die DNA in kompakte Strukturen und fördert die Aufnahme der DNA in die Zelle. Mit der METAFECTENE™-Methode lässt sich in HIT-Zellen eine vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz von maximal 14 % erzielen (Plaumann 2007). Um eine ausreichende Zellmenge für eine Transfektion zu erhalten, wurde pro konfluent bewachsener 15-cm-Zellkulturschale je nach Zelllinie 10-12 kleine 6-cm-Zellkulturschalen ausplattiert, dies entspricht einer Zellmenge von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 6-cm-Zellkulturschale. Dazu wurden wie beim Splitten die Zellen zunächst mit 12 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium inaktiviert und alle noch haftenden Zellen wurden von der Zellkulturschale gewaschen und in ein steriles 50-ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei für 2 min bei RT und 1 300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment vorsichtig in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei RT und 1 300 UpM wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellsediment erneut in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und schließlich in 10-12 ml Kulturmedium pro ursprünglicher 15-cm-Zellkulturschale aufgenommen. In jede 6-cm-Zellkulturschale wurden 4 ml Kulturmedium vorgelegt und je 1 ml der Zellsuspension dazu gegeben. Die frisch ausplattierten Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und entweder innerhalb von einer Stunde (HIT-T15-Zellen und JEG-Zellen) oder 18 h nach Ausplattierung (HEK-293A-Zellen) mit dem Transfektionskomplex behandelt. Der Transfektionskomplex bestand aus 2 Teillösungen: Lösung 1 beinhaltete die zu transfizierende DNA, welche pro Probe (6-cm-Zellkulturschale) je nach Versuch 1,6 bis 5 µg Plasmid-DNA enthielt in einem Gesamtvolumen

von 300 µl serum- und antibiotikafreiem Medium. Lösung 1 wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktions-Gefäß pipettiert. Lösung 2 enthielt je nach Versuch 2 bis 5 µl pro µg Plasmid-DNA Transfektionsreagenz METAFECTENE™ sowie serum- und antibiotikafreies Medium (Gesamtvolumen: 300 µl pro Probe), sodass das Verhältnis von Plasmid-DNA (µg) zu Transfektionsreagenz (µl) 1:2 bis 1:5 entsprach (s.u.). Lösung 2 wurde in einem sterilen 15-ml-Röhrchen pipettiert. Beide Lösungen wurden 5 min inkubiert und anschließend 300 µl von Lösung 2 jeweils auf Lösung 1 gegeben. Die Lösungen wurden miteinander vermischt, wobei dabei äußerst vorsichtig vorgegangen werden musste, da Scherkräfte den DNA-Lipid-Komplex zerstören können. Nach 15- bis 20-minütiger Inkubation des Transfektionskomplexes bei RT wurden je 600 µl dieser Lösung auf eine 6-cm-Schale mit den zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 48 h im Brutschrank inkubiert. Währenddessen erfolgte kein Mediumwechsel.

Pipettierschema für die METAFECTENE™-Transfektion (je ad 300 µl mit serum- und antibiotikafreiem Medium):

	Lösung 1	Lösung 2	Verhältnis
Reportergenassay	1,6 µg DNA	3,2 µl METAFECTENE™	1:2
Western Blot	5 µg DNA	25 µl METAFECTENE™	1:5.

2.6.8. Transfektion von Plasmid-DNA nach der Lipofectamine™-2000-Methode

Transfektionen nach der Lipofectamine™2000-Methode wurden nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Diese Methode eignet sich zur Transfektion von HEK-293A-Zellen. Hierbei wird eine zu ca. 70 % konfluent bewachsene 10-cm-Schale auf eine 6-well-Platte ausplattiert. Dazu wurden wie beim Splitten die Zellen zunächst mit 12 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium inaktiviert und alle noch haftenden Zellen wurden von der Zellkulturschale gewaschen und in ein steriles 50-ml-

Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei RT und 1 300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment vorsichtig in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei RT und 1 300 UpM wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellsediment erneut in 6 ml Kulturmedium resuspendiert. In jede Vertiefung der 6-well-Platte wurde 2 ml Kulturmedium vorgelegt und anschließend 1 ml Zellsuspension zugegeben. Die Zellen wurden 18 h im Brutschrank inkubiert, damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion bereits wieder adhärent wuchsen. Nach 18 h waren die Zellen zu ca. 95 % konfluent. Bei der Lipofectamine™2000-Methode wurden je Vertiefung 4 µg Plasmid-DNA transfiziert, und es wurden 10 µl Lipofectamine™2000-Transfektionsreagenz verwendet. Dazu wurde die Plasmid-DNA in 250 µl serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen, sorgfältig vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsreagenz wurde ebenfalls in 250 µl serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die DNA-Lösung und die Transfektionsreagenz-Lösung vorsichtig miteinander vermischt und 20 bis 25 min bei RT inkubiert, um einen DNA-Reagenz-Komplex zu bilden. In der Zwischenzeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, und es wurde je 2 ml vorgewärmtes serum- und antibiotikafreies Medium auf die Vertiefung zu den Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit des DNA-Reagenz-Komplexes wurden 500 µl davon auf jede Vertiefung gegeben und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert. Nach 5 h wurden 500 µl Inkomplettes Medium hinzugegeben. Nach insgesamt 48 h Inkubation wurden die Zellen geerntet (s. 2.5.10).

2.6.9. Behandlung der Zellen nach der Transfektion

Bei der Behandlung der Zellen mit Proteasom-Inhibitoren wurden die Zellen 12 bis 24 h vor der Ernte mit 5 µl 10 mM Lactacystin (Endkonzentration 10 µM) bzw. mit 5 µl 0,5 mM Epoxomicin (Endkonzentration 0,5 µM) behandelt. Zum Ausschluss der DMSO-toxischen Wirkung wurden auf nicht mit Epoxomicin behandelte Zellen 5 µl DMSO gegeben.

Lactacystin-Stammlösung (10 mM)

Lactacystin (MG 376,43)	1 mg
H ₂ O	265 µl

Epoxomicin-Stammlösung (0,5 mM)

Epoxomicin (MG 554,7)	50 µg
DMSO	180 µl

Gegebenenfalls wurden die Zellen vor der Ernte mit dem MAP-Kinase-Hemmstoff SP600125 (c-jun-NH₂-terminale-Kinase-Inhibitor, kurz: JNK-Inhibitor) behandelt. Die Zugabe erfolgte 12 bis 18 h vor der Ernte bzw. Lyse der transfizierten Zellen. Hierzu wurden 5 µl 25 mM SP600125 (Endkonzentration 25 µM) auf die jeweilige 6-cm-Zellkulturschale gegeben. Zum Ausschluss der DMSO-toxischen Wirkung wurden auf nicht mit dem JNK-Inhibitor behandelte Zellen 5 µl DMSO gegeben.

SP600125-Stammlösung (25 mM)

SP600125 (MG 220,2)	1 mg
DMSO	182 µl

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese an Ribosomen hemmt. Es ist damit ein Translationshemmstoff und eignet sich für die Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins. 5 µl einer Stammlösung von 50 mg/ml wurden 30 min, 1, 3, 6 bzw. 16 h vor der Ernte auf die transfizierten Zellen gegeben (Endkonzentration 50 µg/ml). Zum Ausschluss der Ethanol-toxischen Wirkung wurden auf nicht mit Ethanol behandelte Zellen 5 µl absoluter Ethanol gegeben.

Cycloheximid-Stammlösung (180 mM)

Cycloheximid (MG 281,35)	50 µg
Ethanol absolut	1 ml

2.6.10. Zellernte und Herstellung von Zellextrakten für Reporteragenassays

Kratzpuffer		500 ml
Tris (pH 7,5)	40 mM	20 ml von 1 M Stammlösung
NaCl	150 mM	15 ml von 5 M Stammlösung
EDTA (pH 8,0)	1 mM	1 ml von 0,5 M Stammlösung
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8)		ca. 540 ml
K ₂ HPO ₄	100 mM	500 ml
KH ₂ PO ₄	100 mM	ca. 40 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,8 titriert, indem zuerst Dikaliumhydrogenphosphat vorgelegt und dann langsam unter pH-Kontrolle Kaliumdihydrogenphosphat zugegeben wurde.

Die Zellernte für Reporteragenassays erfolgte 48 h nach der Transfektion. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und je 1 ml Kratzpuffer auf jede Schale gegeben. Die Ablösung der adhären Zellen von der Zellkulturschale erfolgte mithilfe eines Gummispatels. Dazu wurden die Zellen vorsichtig abgekratzt und mit einer Pipette in ein auf Eis gelagertes 1,5 ml Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt. Restliche noch haftende Zellen wurden mit 500 µl Kratzpuffer gespült und ebenfalls in das Eppendorf-Reaktions-Gefäß transferiert. Nach Zentrifugation (5 min, 4 °C, 9 000 UpM) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 150 µl eiskaltem Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM DTT aufgenommen und resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie anschließend in flüssigem Stickstoff einem Gefrierschock versetzt, im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und kräftig geschüttelt. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 4 °C, 14 000 UpM), um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Luciferase- (s. 2.6.1.) und GFP-Aktivität (s. 2.6.2.) wurden im Überstand gemessen.

2.6.11. Zellernte und Herstellung von Zellextrakten für Proteinanalytik

Lysis-Puffer		10 ml	verwendete Stammlösung (s. 2.2.3)
HEPES (pH 7,5)	50 mM	1 ml	HEPES 0,5 M
NaCl	150 mM	300 µl	NaCl 5 M
MgCl ₂	1,5 mM	15 µl	MgCl ₂ 1 M
EGTA	1 mM	56 µl	EGTA 180 mM
NP-40	1 % (v/v)	1 ml	NP-40 10 %
Triton X-100	1 % (v/v)	1 ml	Triton X-100 10 %
Glycerin (87%ig)	10 % (v/v)	1,15 ml	

Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C. Frisch dazu gegeben wurden:

Phosphatase Inhibitor 10x

Protease Inhibitor 7x

Die Zellernte für die Proteincharakterisierung erfolgte 48 h nach der METAFECTENETM-Transfektion (s. 2.6.7). Dazu wurde das Medium der 6-cm-Zellkulturschale sorgfältig abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gesetzt, und es erfolgte die rasche Zugabe von 150 µl Lysis-Puffer zur Zelllyse. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und kräftig geschüttelt. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt, und anschließend wurden die Zellen zur Lyse 20 min auf Eis gelagert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 14 000 UpM, um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand enthielt das Proteinlysate und wurde in ein neues Eppendorf-Reaktions-Gefäß überführt. Je 1 µl der Proben wurde für die Konzentrationsmessung eingesetzt, die restlichen Proteine wurden anschließend für die Proteinanalytik verwendet oder mit 4x Lämmli-Puffer versetzt eingefroren (s. 2.8.2).

2.7. Luciferaseassay und GFP-Nachweis

2.7.1. Nachweis der Luciferase-Reportergen-Aktivität

Glycylglycin-Puffer		1 l
Glycylglycin (pH 7,8)	25 mM	28 ml von 0,5 M Glycylglycin-Stammlösung
MgSO ₄	15 mM	7,5 ml von 1 M MgSO ₄ -Stammlösung
EGTA (pH 8,0)	4 mM	11,1 ml von 180 mM EGTA-Stammlösung
Luciferin-Lösung		für 180 ml
DTT	10 mM	275 mg
Luciferin	1 mM	50 mg
Glycylglycin-Puffer		178,5 ml

Die Luciferin-Lösung wurde lichtgeschützt zu 1,4 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Luciferase-Assay-Mix		für 24 Proben
Kaliumphosphatpuffer	16,5 mM	1,5 ml
Glycylglycin-Puffer	82,4 % (v/v)	7,5 ml
DTT	1,1 mM	10 µl von 1 M DTT-Stammlösung
ATP	2,2 mM	100 µl von 200 mM ATP-Stammlösung
Luciferin-Mix		für 24 Proben
Luciferin	1 mM	1,4 ml von Luciferin-Lösung
DTT	10 mM	56 µl von 1M DTT-Stammlösung
Glycylglycin-Puffer		5,6 ml Glycylglycin-Puffer

Der Luciferin-Mix wurde lichtgeschützt auf Eis hergestellt.

Das Luciferaseassay dient der quantitativen Messung der transkriptionellen Aktivität eines Promotors. Dabei wird die Aktivität des Enzyms Luciferase gemessen, welches unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht. Das Enzym Luciferase, ursprünglich vom Glühwürmchen *photinus pyralis* gebildet, wird in denjenigen Zellen exprimiert, welche vorher mit dem Reporter gen für die Luciferase transfiziert wurden.

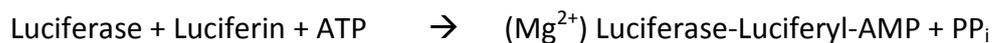


Abb. 2.17: Oxidative Decarboxylierung von Luciferin.

Die Luciferase katalysiert in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen und ATP die oxidative Decarboxylierung des Substrats Luciferin zu Oxyluciferin (De Wet et al. 1987).

Bei der Reaktion (s.o.) wird Licht einer Wellenlänge von 560 nm emittiert. Die Lichtmenge ist bei Substratüberschuss proportional zur Luciferasemenge und dient der quantitativen Aktivitätsmessung des Reporter genpromotors.

Für das Luciferaseassay wurden 368 μl Luciferase-Assay-Mix (auf Eis hergestellt) mit 50 μl Zellextrakt je Probe (s. 2.6.10.) in Luminometerröhrchen pipettiert und vermischt. Die Messung erfolgte im Luminometer (Auto-Lumat LB 953), welches mit gekühltem Luciferin-Mix bestückt wurde. Bei jeder Probe wurde automatisch eine Leerwertmessung für 6 sek sowie die Messung des emittierten Lichtes nach Zugabe von 200 μl Luciferin-Lösung über einen Zeitraum von 20 sek vorgenommen. Die gemessenen Rohdaten wurden als relative Lichteinheiten (RLU) dargestellt.

2.7.2. Quantitativer Nachweis der GFP-Reporter-gen-Aktivität

Die Durchführung des GFP-Reporter-genassays diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Ermittlung der GFP-Aktivität. GFP (green fluorescent protein) ist ein fluoreszierendes Protein, welches aus der Qualle *aequorea victoria* isoliert werden kann. Nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann die Intensität der Fluoreszenz detektiert werden, welche mit der Menge an GFP in der Probe korreliert (Chalfie et al. 1994). Um die Transfektionseffizienz beim Luciferaseassay zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem für GFP kodierenden Plasmid CMV-pGFPTpz cotransfiziert. Zur Bestimmung der GFP-Menge in den Zellen wurden je 50 µl Zellextrakt (s. 2.6.10) in eine 96-well-Platte pipettiert, und anschließend wurde die Fluoreszenz im computergesteuerten Fluorometer (Fluorometer Fusion™) gemessen. Dabei wurden die Proben mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt, und die Fluoreszenz wurde bei 530 nm für 1 sek bei einer Signalverstärkung von 1100 V gemessen. Die Quantität an Fluoreszenz wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

2.7.3. Qualitativer Nachweis der GFP-Reporter-gen-Aktivität

Neben der quantitativen Messung der GFP-Aktivität lässt sich die Transfektionseffizienz auch durch fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der transfizierten Zellen (Zeiss Axiovert 200 Mikroskop) darstellen. Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm kommt es bei denjenigen Zellen, die erfolgreich mit einem GFP-kodierenden Plasmid transfiziert wurden, zu einer Lichtemission bei 530 nm, welche mit einem speziellen Filter am Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. GFP-transfizierte Zellen leuchten demnach für den Untersucher grün (s. Abb. 3.14, S. 103).

2.8. Proteinanalytische Methoden

2.8.1. Proteingehaltsmessung

Um im Western Blot gleiche Proteinmengen miteinander zu vergleichen, ist es erforderlich, die genaue Konzentration der Proteine im Zelllysat zu kennen. Dazu wurde das Bio-Rad-Protein-Assay genutzt. Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau-G250 in drei verschiedenen Zuständen Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbiert.



Abb. 2.18: Reaktionsgleichung für die Proteinbestimmung nach Bradford.

In seiner ungebundenen, kationischen Form hat Coomassie Brilliant Blau ein Absorptionsspektrum von 470 nm; bindet es an ein Protein, so wechselt es in den anionischen Zustand, welcher eine Absorption bei 595 nm hat.

Die Absorptionsänderung bei Proteinbindung ist in weiten Bereichen der Proteinkonzentration proportional. Man benötigt eine Standardkurve für ein definiertes Protein wie beispielsweise BSA (*bovine serum albumin*), da verschiedene Proteine verschieden stark mit Coomassie Brilliant Blau-G250 binden. Dazu wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe von BSA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,313 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine Eichkurve erstellt, aus welcher ablesbar war, in welchem Bereich eine lineare Absorptionsänderung stattfand und wie ausgeprägt die Absorptionsänderung war.

Für die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes der Proben wurde 1 μl von diesen in einer 1 cm Kunststoffküvette mit 800 μl H_2O bidest. vermischt und anschließend 200 μl filtriertes Bio-Rad-Reagenz hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Als Leerwert diente 800 μl H_2O bidest. mit 200 μl Bio-Rad-Reagenz. Nach 10 min war der Protein-Farbstoff-Komplex stabil und konnte nun im Spektralphotometer (UV-160, Shimadzu) bei einer Extinktion von 595 nm gemessen werden. Die gemessenen Extinktionen wurden mithilfe der zuvor erstellten Eichkurve in Konzentrationen umgerechnet. Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Proben, welche gleiche Proteinmengen beinhalten sollten. Dazu wurden meist 150 bis

200 µg Proteinlysate, 4x SDS-Lämmli-Puffer (s.u.) und zum Volumenausgleich Lysis-Puffer ohne Inhibitoren pipettiert und die Proben bei 95 °C für 5 min gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren, oder sie wurden sofort für die SDS-PAGE verwendet.

2.8.2. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Lämmli-Puffer	4x	100 ml
Tris (pH 6,8)	250 mM	25 ml von 1 M Stammlösung
Glycerin	40 % (v/v)	45,9 ml 87 % Glycerin
SDS	8 % (w/v)	8 g
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)	10 ml
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)	40 mg

Lämmli-Puffer wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Trenngelpuffer		200 ml
Tris (pH 8,8)	1,5 M	36,24 g
Sammelgelpuffer		200 ml
Tris (pH 6,8)	0,5 M	12,14 g
Laufpuffer		1 l
Tris (pH 8,3)	25 mM	3,03 g
Glycin	192 mM	14,41 g
SDS	0,1 % (w/v)	10 ml von 10 % Stammlösung

Alle Puffer wurden mit HCl auf den jeweils benötigten pH-Wert titriert.

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichtes (in kDa) (Laemmli 1970). Die zuvor denaturierten Proteine binden dabei mit dem anionischen Detergens SDS und werden dadurch negativ geladen. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht. Um die Proteinwanderung zu beobachten, wird Bromphenolblau zu den Proben gegeben. Die Proteinproben werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und Strom angelegt, entlang dessen die negativ geladenen Proteine migrieren. Kleine Proteine wandern dabei schneller durch das Gel. Das Gel besteht zum einen aus einem Trenngel, welches in seiner Konzentration abhängig von der zu bestimmenden Proteingröße schwankt, und zum anderen aus einem Sammelgel, in welchem zunächst die Proteine auf einer Höhe wandern, um einen gemeinsamen Startpunkt für die Trennung im Trenngel zu gewährleisten. Die Gele setzen sich nach folgendem Schema zusammen:

<u>Sammelgel</u>		<u>4%</u>	<u>Trenngel</u>		<u>10%</u>
Acrylamidstammlösung	0,67 ml		Acrylamidstammlösung	3,33 ml	
Sammelgelpuffer	1,25 ml		Trenngelpuffer	2,5 ml	
SDS 10 % Stammlösung	50 µl		SDS 10 % Stammlösung	100 µl	
H ₂ O bidest.	2,98 ml		H ₂ O bidest.	4,0 ml	
APS 10 % Stammlösung	50 µl		APS 10% Stammlösung	100 µl	
TEMED	2,4 µl		TEMED	6 µl.	

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Gele in einer Gießkammer unter Verwendung einer Glasplatte, einer Aluminiumplatte, zwei Platzhaltern rechts und links und schließlich eines geeigneten Kammes gegossen. Sämtliche Materialien wurden zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt und in die Gießkammer eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel vorsichtig zu etwa zwei Dritteln in die Gelkammer gegossen. Um Luftblasen an der Trennschicht zu vermeiden sowie eine glatte Übergangsfläche zu gewährleisten, wurde 1 ml Isopropanol auf alle Gele gegeben. Nach 20 min war das Trenngel polymerisiert, das Isopro-

panol wurde abgenommen und nun das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Der Kamm für die Probenaschen wurde zügig in das noch flüssige Gel gegeben, und es erfolgte die Polymerisation. Nach 20 min konnte das Gel für die Gelelektrophorese verwendet werden. Dazu wurden ein oder zwei Gele in die Gelelektrophoresekammer eingespannt, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und die Kämmen vorsichtig aus dem Gel gezogen. Vorhandene Gelreste wurden mittels einer 20-G-Kanüle und einer 5-ml-Einmalspritze, gefüllt mit Laufpuffer, vorsichtig aus den Taschen entfernt. Ein Proteingrößenmarker (s. 2.2.8., S. 28) wurde in die erste Tasche pipettiert und die zuvor hergestellten Proteinproben (s. 2.7.1., S. 68) wurden mit gleichen Volumina der Reihe nach in die folgenden Taschen pipettiert. Pro Gel wurde zunächst im Bereich des Sammelgels Strom von 20 mA angelegt, nach Erreichen des Trenngels Strom von 25 mA. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war. Das Gel wurde aus den Kammern genommen, von Glas- und Aluminiumplatte gelöst und für den Western Blot weiterverwendet.

2.8.3. Semi-Dry-Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Puffer A (Anodenpuffer)		1 l
Tris pH 11,3	300 mM	36,6 g
Methanol	20 % (v/v)	200 ml
Puffer B (Blotpuffer)		1 l
Tris pH 10,5	25 mM	3,05 g
Methanol	20 % (v/v)	200 ml
Puffer C (Kathodenpuffer)		1 l
Tris pH 9,0	25 mM	3,05 g
Methanol	20 % (v/v)	200 ml

Der pH-Wert wurde mit 2 M Borsäure titriert.

Beim Proteintransfer (Western Blot) wird ein senkrecht zur Geloberfläche stehendes elektrisches Feld angelegt, sodass die zuvor aufgetrennten Proteinbanden aus dem Gel auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen werden können. Die Proteine auf der Membran sind anschließend für weitere Methoden zugänglich. Die hier verwendete Transfermethode ist die Semi-Dry-Methode. Dazu wurde das Gel nach der SDS-PAGE vorsichtig aus den Gelgießkammerplatten befreit, das Sammelgel wurde vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel für 20 min in Puffer C geschwenkt. Die Nitrocellulosemembran wurde für 10 min in Puffer B geschwenkt. Whatman-Papiere wurden je in Puffer A, B und C geschwenkt. Die Abmessungen von Gel, Membran und Papieren waren gleich groß. Die in Lösung getränkten Materialien wurden gemäß Abb. 2.19 in einer Blotkammer angeordnet, wobei darauf geachtet wurde, dass zwischen den Schichten keine Blasen entstanden.

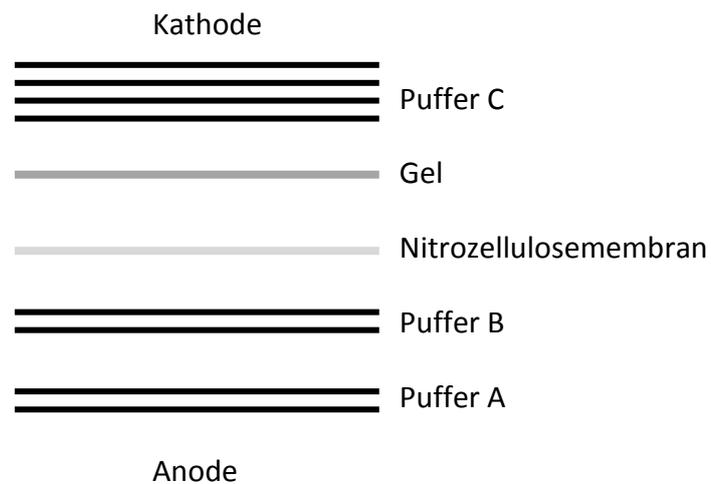


Abb. 2.19: Aufbau einer Blotkammer.

Die Blotkammer bestand aus einer Kathodenplatte und einer Anodenplatte, und entlang eines konstanten Stromes von 75 mA pro Gel über 60 min wanderten die Proteine vom Gel auf die Membran.

2.8.4. Immunologischer Nachweis von Proteinen

TBS-T	0,1%	1 l
Tris (pH 8,0)	10 mM	10 ml von 1 M Stammlösung
NaCl	150 mM	30 ml von 5 M Stammlösung
Tween 20	0,1 % (v/v)	1 ml
<u>Blockpuffer</u>		50 ml
Trockenmilchpulver	5 % (w/v)	2,5 g
TBS-T		ad 50 ml
<u>Antikörperlösung 1</u>		50 ml
BSA	5 % (w/v)	2,5 g
TBS-T		ad 50 ml
<u>Antikörperlösung 2</u>		50 ml
Trockenmilchpulver	1 % (w/v)	0,5 g
TBS-T		ad 50 ml

Um die durch das Blotten auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine quantitativ nachweisen zu können, wurde die Membran mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Dazu mussten zunächst unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert werden, indem die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer auf einer Schüttelplattform inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit den entsprechenden Primärantikörpern (Verdünnung und Puffer s. 2.2.5) über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplattform. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst dreimal für 7 min bei RT in TBS-T gewaschen. Um den an das Protein gebundenen Primärantikörper mittels Chemolumineszenz detektierbar zu machen, wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert, welcher an

den Primärantikörper einer anderen Spezies (z. B. Kaninchen oder Maus) bindet und gleichzeitig an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT in geeigneter Verdünnung (s. 2.2.5). Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch erneute Waschschriffe (dreimal 7 min in TBS-T) entfernt. Anschließend erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz, bei welcher die Meerrettich-Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Reduktion von Wasserstoffperoxid bewirkt. Die Lumineszenz konnte durch das VersaDoc™ Imaging System detektiert werden. Hierzu wurde die Membran mit je 200 µl der Peroxidlösung und der Luminol-Entwicklerlösung des Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) gleichzeitig für ca. 1 bis 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Parafilm® eingeschlagen und in das VersaDoc™ Imaging System (Bio-Rad) platziert. Abhängig von der Menge der Proteine sowie der Qualität der Antikörper betrug die Entwicklungszeit 2 sek bis 20 min. Mithilfe der Software Quantity One 1D Version 4.6.5 (Bio-Rad) konnten die Proteine dargestellt werden, wobei die Intensität der Banden mit der Proteinmenge korrelierte. Es folgte die quantitative densitometrische Auswertung.

2.8.5. Wiederaufbereitung von Nitrozellulosemembranen

Um die bereits verwendete Nitrozellulosemembran auf ein anderes Protein hin zu untersuchen, musste diese zunächst in einem kurzen Waschschriffe in TBS-T von der Entwicklerlösung befreit werden. Anschließend wurde die Membran für 30 min in 200 mM Glycin Puffer (pH 2,5) bei RT inkubiert, erneut gewaschen, geblockt und mit einem neuen Primärantikörper inkubiert (s.o.).

2.9. Statistik und Auswertung

Die dargestellten Ergebnisse stellen jeweils den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes ($SEM = SD/\sqrt{n}$) der Messergebnisse identisch behandelte Proben dar (Mittelwert \pm SEM).

Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der gepaarte zweiseitige Student's-t-Test mit Hilfe von Microsoft® Excel 2007 angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ (*) festgelegt. Bei Experimenten mit verschiedenen Gruppen wurde ein ANOVA-Test mit dem Programm Statistika durchgeführt.

Die Anzahl der Versuche in Einfachbestimmung wurde mit n angegeben.

Die Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme SigmaPlot (Version 11.0), Vector NTI® und CorelDRAW X3 (Version 13) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Wirkung von der DLK auf verschiedene Promotoren in Abhängigkeit von der DLK-Lokalisation

3.1.1. Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität von MafA in der β -Zelllinie HIT

Das Ziel der nachfolgenden Untersuchung war, die Wirkung der Dual Leucine Zipper Kinase auf die transkriptionelle Aktivität von MafA zu untersuchen und ob diese Wirkung von der enzymatischen Aktivität von DLK und ihrer subzellulären Lokalisation abhängt.

Hierfür wurden transiente Transfektionen in der β -Zelllinie HIT durchgeführt. Dazu wurde das Gal4-System verwendet: HIT-Zellen wurden transient transfiziert mit G5E1BLuc, einem Luciferasereportergen unter der Kontrolle von fünf Kopien der DNA-Bindungsstelle des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 (s. Abb. 3.1 A). Cotransfiziert wurden Gal4 (1-147) und Gal4-MafA (1-233). Gal4 (1-147) enthält die Gal4-DNA Bindungsdomäne, Gal4-MafA (1-233) enthält zusätzlich die erweiterte Transaktivierungsdomäne von MafA. Dabei wird MafA über die Gal4-Bindungsdomäne an den Promotor rekrutiert. Die Messung der transkriptionellen Aktivität von MafA ist damit relativ hintergrundfrei. Cotransfiziert wurde der Leervektor Bluescript (BS) sowie die verschiedenen DLK Expressionsplasmide: der DLK Wildtyp (DLK wt) (Holzman et al. 1994), die katalytisch inaktive Mutante DLK K185A (Mata et al. 1996) sowie zwei verschiedene Punktmutanten der Kernerkennungssequenz, die eine Lokalisation der DLK in den Kern verhindern, DLK NLS1 und NLS2 (Wallbach 2010).

Abb. 3.1 B ist zu entnehmen, dass bei Überexpression von Gal4-MafA (1-233) im Vergleich zur Kontrolle Gal4 (1-147) die Luciferaseaktivität um ein mehr als 100-faches anstieg. Gleichzeitige Überexpression von DLK wt hemmte die Aktivität der Transaktivierungsdomäne von MafA (von 100 % \pm 5,3 (Kontrolle) auf 57,1 % \pm 2). Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante DLK K185A führte zu keiner Hemmung (105,1 % \pm 5,9). Die Mutanten DLK NLS1 und

NLS2 hatten ebenso wie der DLK wt eine inhibitorische Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von MafA ($68,5 \% \pm 4,1$ bzw. $63 \% \pm 4,3$).

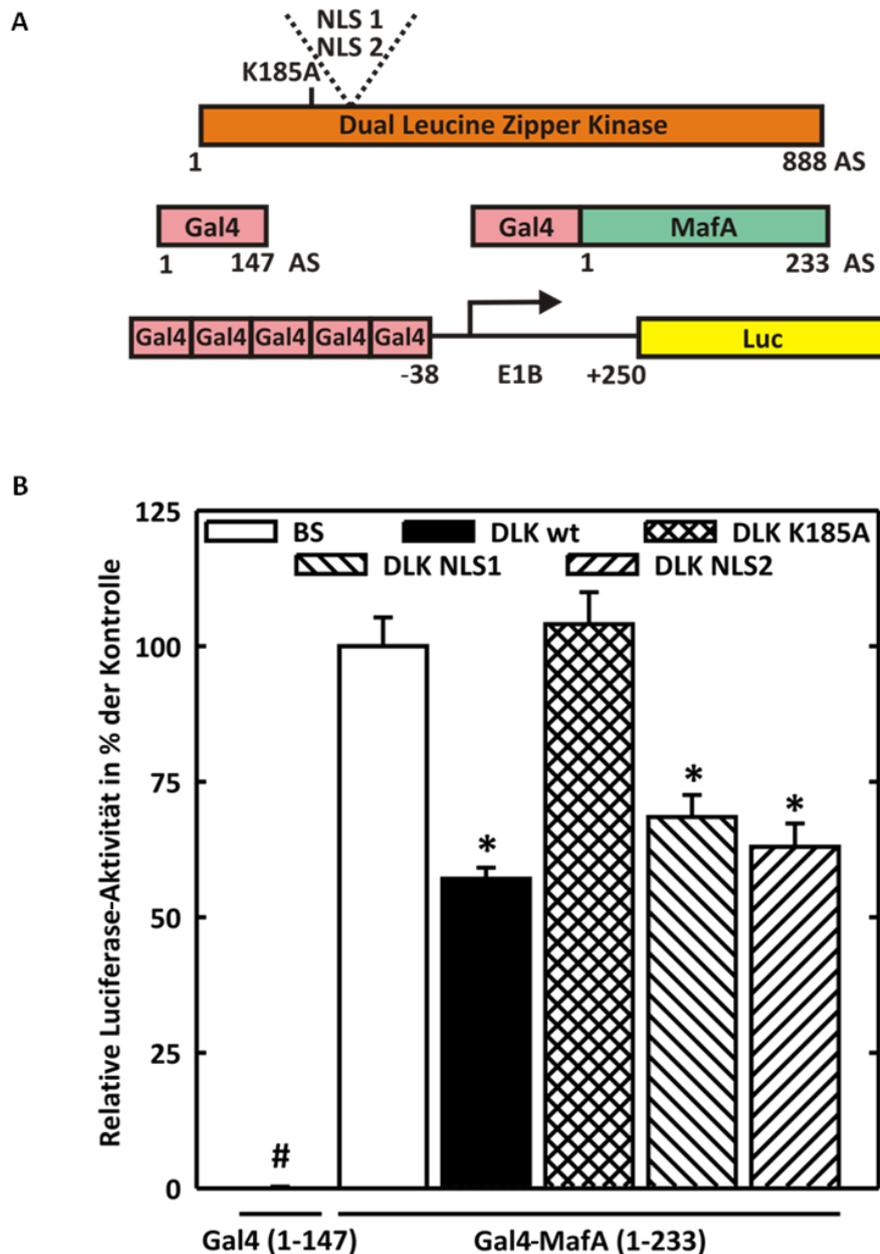


Abb. 3.1: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität von MafA in der β -Zelllinie HIT.

A Verwendete Expressions- bzw. Reporter-genkonstrukte. **B** HIT-T15-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporter-genplasmid G5E1BLuc. Cotransfiziert wurde BS (Kontrolle) und die Expressionsvektoren für DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1, DLK NLS2, Gal4 (1-147) und Gal4-MafA (1-233) sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). Signifikanzen: #, * $p \leq 0,05$ (t-Test), jeweils in Bezug zur Kontrolle BS (weiße Säule).

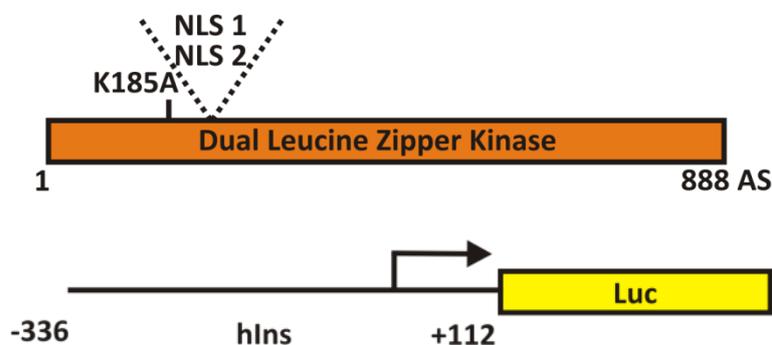
3.1.2. Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulins in der β -Zelllinie HIT

MafA ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation der Insulinttranskription. Es sollte untersucht werden, welchen Effekt die Dual Leucine Zipper Kinase auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulins hat und, ob dieser Effekt von der enzymatischen Aktivität von DLK und ihrer subzellulären Lokalisation abhängt.

Dazu wurde die β -Zelllinie HIT transient transfiziert mit dem Reportergen Luciferase unter der Kontrolle des Promotors des humanen Insulins (Oetjen et al. 2003a). Cotransfiziert wurde als Kontrolle der Leervektor BS und sowie die Expressionsvektoren von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und DLK NLS2.

Abb. 3.2 A zeigt eine schematische Darstellung der transfizierten Plasmide. Durch das Reportergen Luciferase konnte die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulins quantifiziert werden (Abb. 3.2 B). Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle ($100\% \pm 6$) die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulins bei zusätzlicher Überexpression von DLK wt um die Hälfte reduziert wurde ($49,6\% \pm 9,1$). Bei Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante DLK K185A war dieser hemmende Effekt nicht detektierbar ($109,8\% \pm 5,4$). Bei Überexpression der Kernerkenntnissequenz-Mutanten DLK NLS1 und DLK NLS2 war ebenfalls ein hemmender Effekt zu beobachten. DLK NLS1 reduzierte die Aktivität des Promotors des humanen Insulins auf $78,9\% \pm 8,3$; dieser Effekt war bezogen auf DLK K185A signifikant. DLK NLS2 reduzierte die Aktivität des Promotors des humanen Insulins auf $57,5\% \pm 6,7$; dieser Effekt war sowohl im Vergleich zur Kontrolle (BS) als auch zu DLK K185A signifikant.

A



B

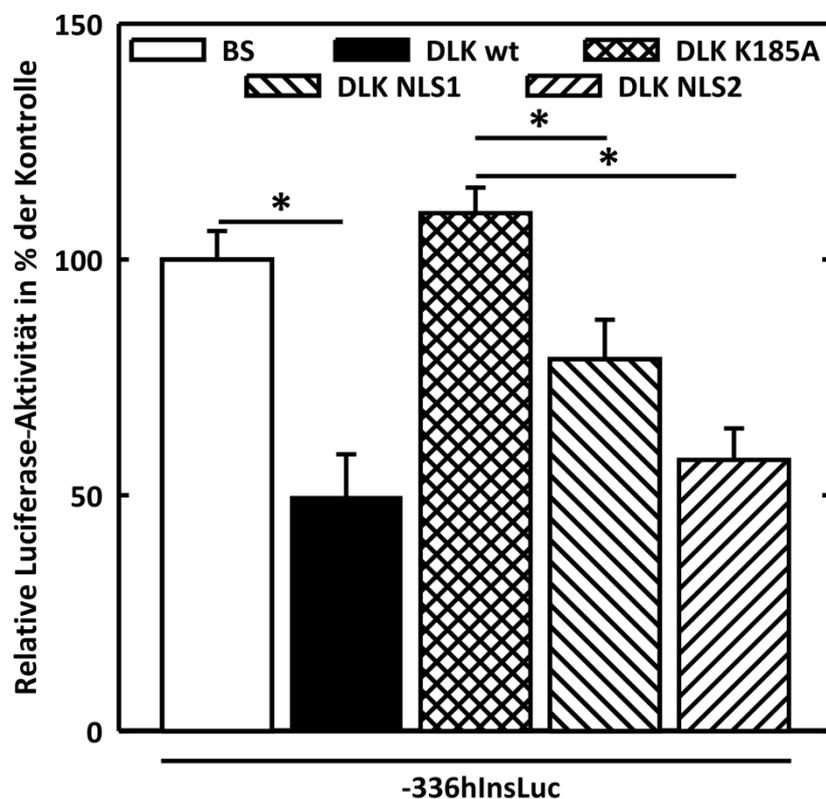


Abb. 3.2: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulins in der β -Zelllinie HIT.

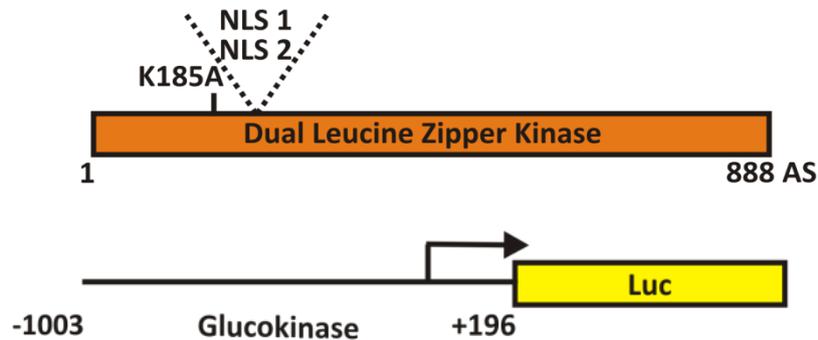
A Verwendete Expressions- und Reporter-genkonstrukte. **B** HIT-T15-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporter-genplasmid -336hInsLuc, dem Leervektor BS (Kontrolle) und den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und DLK NLS2, sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.1.3. Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Glucokinasepromotors in der β -Zelllinie HIT

MafA ist in die Regulation von vielen β -zellspezifischen Genen involviert (Wang H et al. 2007). Es existieren Hinweise darauf, dass die als Glucosesensor fungierende Glucokinase positiv durch MafA reguliert wird (Kaneto et al. 2005c; Wang H et al. 2007). Um zu untersuchen, ob die DLK auf dieses weitere MafA-abhängige β -zellspezifische Gen einen Einfluss hat, wurden transiente Transfektionen in der β -Zelllinie HIT durchgeführt. Es wurde ein Luciferase-Reportergenplasmid für den Glucokinasepromotor der Ratte, als Kontrolle Bluescript, der DLK wt, die DLK Kinase-tote Mutante K185A und die Kernerkenungssequenzmutanten DLK NLS1 und NLS 2 überexprimiert.

Abb. 3.3 A zeigt die verwendeten Expressionsplasmide und das Reportergenkonstrukt. Aus Abb. 3.3 B ist ersichtlich, dass im Vergleich zur basalen Glucokinasepromotoraktivität (100 % \pm 1,3) bei Überexpression von DLK wt eine Verminderung der Promotoraktivität nachweisbar war (auf 56,3 % \pm 5,3). Die Hemmung war jedoch nicht nachweisbar bei Überexpression der Kinase-toten Mutante DLK K185A (165,5 % \pm 35,1). Auch die Kernerkenungssequenz-Mutanten DLK NLS1 und NLS2 hatten keinen inhibitorischen Effekt auf die Glucokinasepromotoraktivität (201,2 % \pm 33,2 respektive 128,3 % \pm 23,7).

A



B

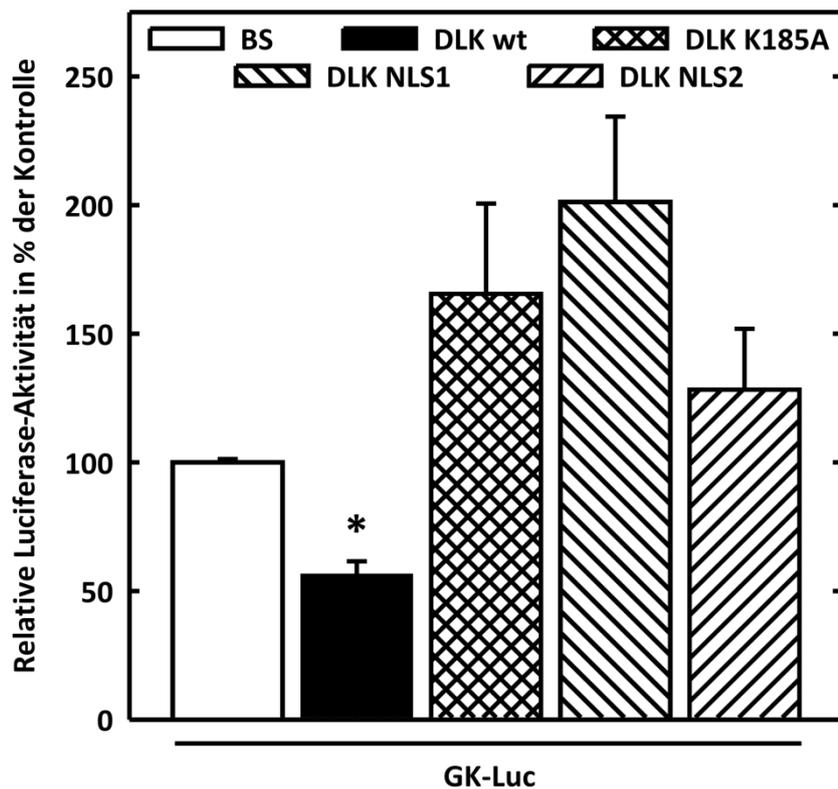


Abb. 3.3: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Glucokinasepromotors in der β -Zelllinie HIT.

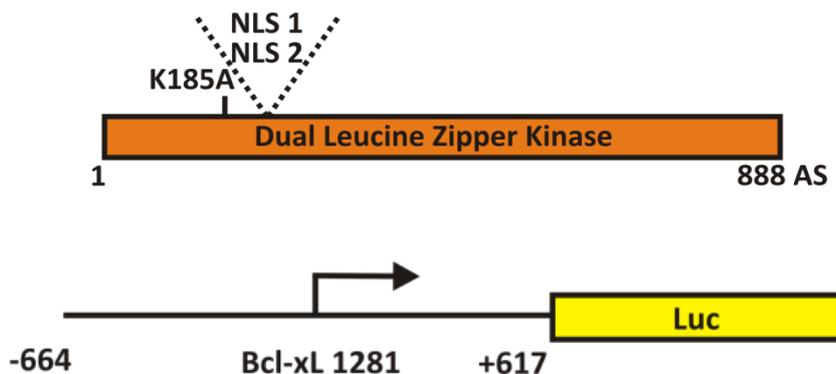
A Verwendete Expressions- bzw. Reporter-genkonstrukte. **B** HIT-T15-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporter-genplasmid pGK-Luc. Cotransfiziert wurde BS (Kontrolle) und die Expressionsvektoren für DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und DLK NLS2 sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test), in Bezug zur Kontrolle (BS 100%).

3.1.4. Wirkung von DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1 und NLS2 auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Promotors in der β -Zelllinie HIT

Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lieferten Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der DLK zu einer vermehrten β -Zell-Apoptose führt. Dabei wurde festgestellt, dass der apoptose-induzierende Effekt der DLK im Kern der β -Zellen stattfindet (Wallbach 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob DLK einen Einfluss auf das anti-apoptotische Protein Bcl-xL in β -Zellen hat, und ob dieser Einfluss von der zellulären Lokalisation der DLK abhängt.

Dazu wurde ein Reporter-genkonstrukt, welches unter der Kontrolle des Promotors von Bcl-xL steht, transient in die β -Zelllinie HIT transfiziert. Zusätzlich wurden DLK wt, DLK K185A und die Kernerkenungssequenz-Mutanten DLK NLS 1 und DLK NLS 2 transfiziert. Abb. 3.4 A zeigt ein Schema der verwendeten Expressionsplasmide und des Reporter-genkonstruktes. Abb. 3.4 B ist zu entnehmen, dass in HIT-Zellen eine basale Aktivität des Bcl-xL-Promotors nachweisbar war (weiße Säule). Diese unstimulierte Aktivität war vermindert bei Überexpression von DLK wt (von 100 % \pm 4,1 auf 55,7 % \pm 4,7). Die inhibitorische Wirkung war jedoch bei Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante DLK K185A nicht vorhanden (136,9 % \pm 6,7). Die Überexpression von DLK NLS1 und NLS2 hatte ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt auf die Promotoraktivität des Bcl-xL-Gens (110 % \pm 9,4 bzw. 80,8 % \pm 8).

A



B

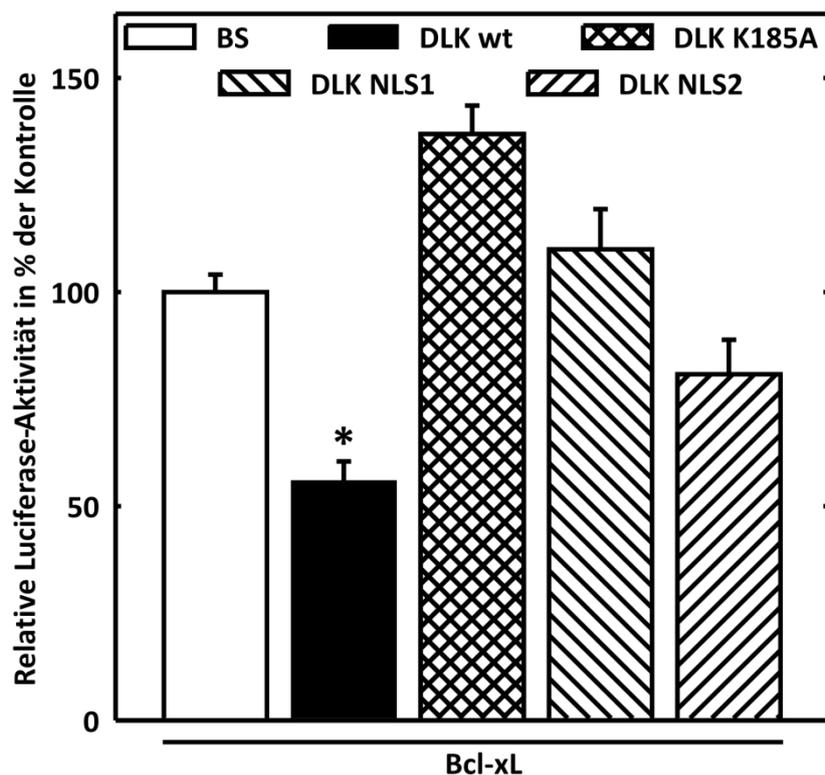


Abb. 3.4: Wirkung von DLK und DLK-Mutanten auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Genpromotors in der β -Zelllinie HIT.

A Verwendete Expressions- bzw. Reporter-genkonstrukte. **B** HIT-T15-Zellen wurden transient transfiziert mit BS (Kontrolle) und den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK K185A, DLK NLS1, DLK NLS2 und Bcl-xL 1281. Cotransfiziert wurde das Reporter-genplasmid GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test), jeweils in Bezug zur Kontrolle (BS 100 %).

3.2. Wirkung von DLK auf phosphorylierungsdefiziente MafA-Mutanten

3.2.1. Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die transkriptionelle Aktivität von MafA-Mutanten in der β -Zelllinie HIT

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren 49, 53, 57, 61 und 65 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von MafA von Bedeutung für seine proteasomale Degradation sind. Dabei werden die Aminosäuren sequenziell und kaskadenartig von GSK-3 vom C- zum N-Terminus hin phosphoryliert. Eine Mutation von Serin oder Threonin in Alanin verhindert die Phosphorylierung; dadurch können auch alle weiteren N-terminal gelegenen Aminosäuren nicht mehr phosphoryliert werden (Han et al. 2007; Rocques et al. 2007; Guo S et al. 2009; Kondo et al. 2009).

Um zu untersuchen, welchen Effekt die DLK auf die transkriptionelle Aktivität von MafA und seinen Mutanten in der β -Zelllinie HIT hat, wurde das Gal4-System verwendet (s. auch Kap. 3.1.1). Dazu wurden HIT-Zellen transient transfiziert mit dem Reporter gen G5E1B-Luc (Luciferasegen unter der Kontrolle von fünf DNA-Bindungsstellen für Gal4). Cotransfiziert wurden Gal4-DBD (als Kontrolle), Gal4-MafA wt, Gal4-MafA 4A (Aminosäure Serin-49, Threonin-53, Threonin-57 und Serin-61 in Alanin mutiert), Gal4-MafA 5A (zusätzlich auch Serin-65 in Alanin mutiert), sowie DLK wt bzw. DLK K185A (entsprechend Abb. 3.5 A).

Aus der Darstellung in Abb. 3.5 B ist zu entnehmen, dass es bei Überexpression des Gal4-MafA wt im Vergleich zu Gal4-DBD zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität kam (von 13,9 % \pm 2,8 auf 100 % \pm 2,5). Die basale transkriptionelle Aktivität von Gal4-MafA 4A war kaum verändert im Vergleich zu Gal4-MafA wt (107,7 % \pm 21,6), die basale transkriptionelle Aktivität der Mutante Gal4-MafA 5A war jedoch um das Dreieinhalbfache erhöht (368,2 % \pm 85,4) (jeweils weiße Säule) ($p = 0,0004$). Bei Cotransfektion von Gal4-MafA wt und DLK wt kam es zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität auf die Hälfte (49,3 % \pm 8,5), die bei Überexpression von DLK K185A nicht beobachtet werden konnte (101,4 % \pm 11). Auch bei Überexpression der Mutante Gal4-MafA 4A war ein durch den DLK wt vermittelter hemmender Effekt auf die transkriptionelle Aktivität auf ca. die Hälfte zu

beobachten (von $107,7\% \pm 21,6$ auf $58,1 \pm 7,3$); ebenfalls nicht vorhanden bei Überexpression von DLK K185A ($113,9\% \pm 17,2$). Ebenso wurde die transkriptionelle Aktivität der Mutante Gal4-MafA 5A durch den DLK wt um die Hälfte (von $368,2\% \pm 85,4$ auf $191,8\% \pm 47,7$), nicht jedoch durch DLK K185A ($408,8\% \pm 84,7$) gehemmt.

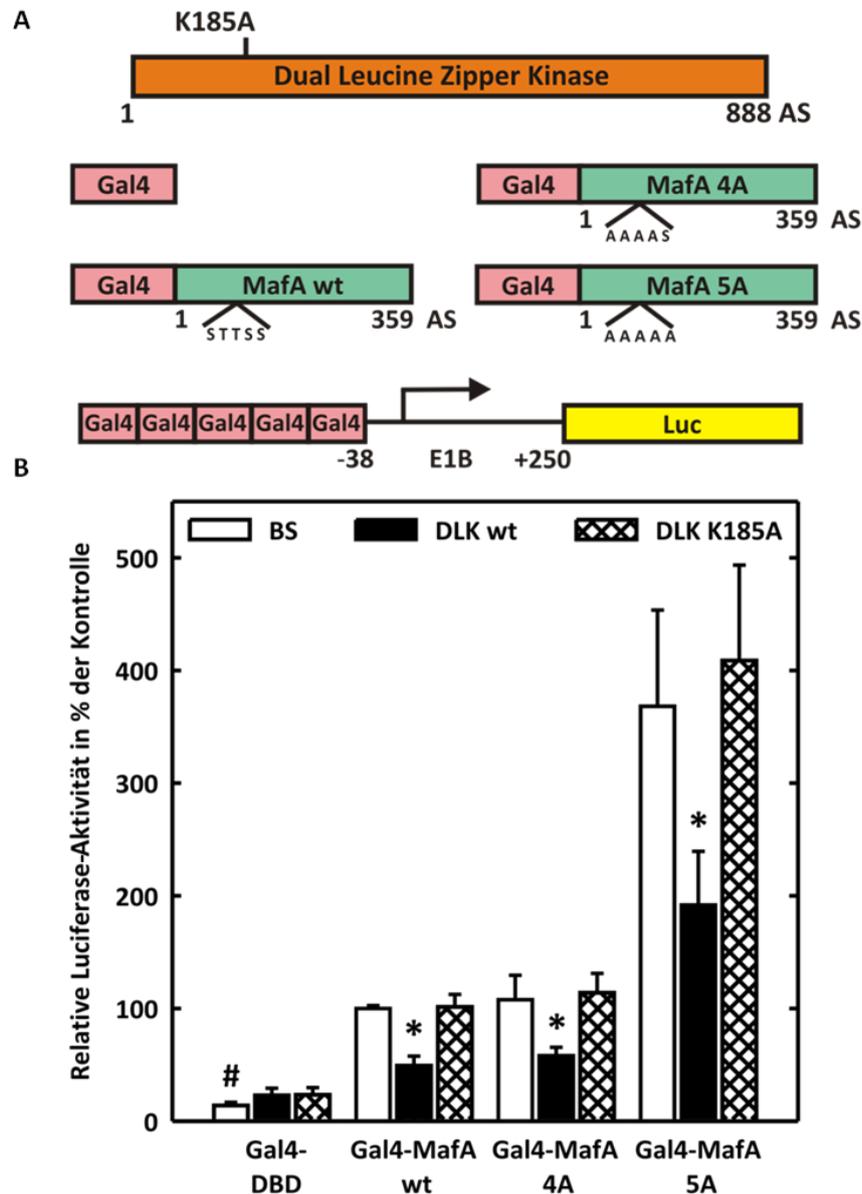


Abb. 3.5: Wirkung von DLK auf die transkriptionelle Aktivität von verschiedenen MafA-Mutanten in der β -Zelllinie HIT.

A Verwendete Expressions- bzw. Reportergernekonstrukte. **B** HIT-T15-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporterplasmid G5E1BLuc. Cotransfiziert wurden Expressionsvektoren für BS (Kontrolle), DLK wt, DLK K185A, Gal4-DBD, Gal4-MafA 4A, und Gal4-MafA 5A sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus sechs unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung ($n=12$). * $p \leq 0,05$ (t-Test), jeweils in Bezug zur Kontrolle der Gruppe (BS), #, $p < 0,05$ (t-Test), bezogen zu BS 100 % (zweite weiße Säule).

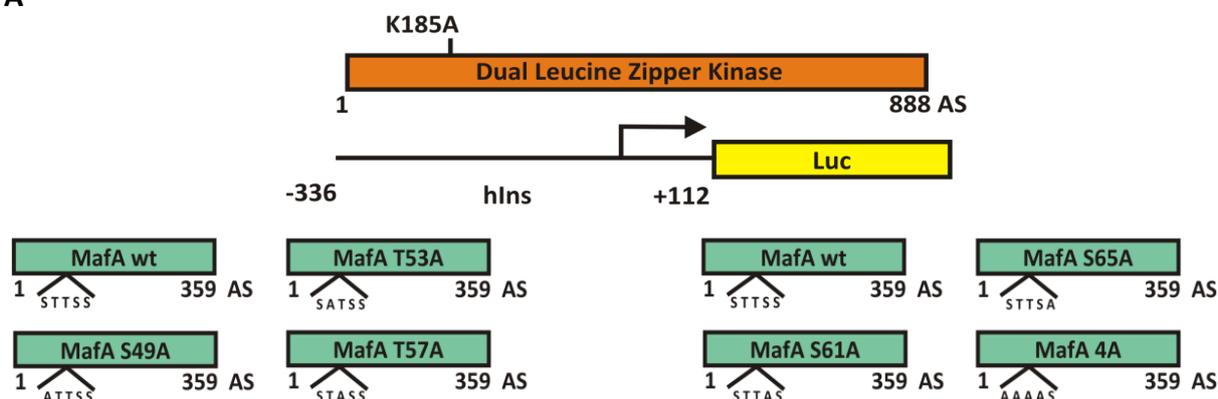
3.2.2. Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Mutanten-abhängige Insulingentranskription in der Nicht- β -Zelllinie JEG

Es sollte der Einfluss von verschiedenen MafA-Punkt-Mutanten innerhalb der Transaktivierungsdomäne auf die transkriptionelle Aktivität des Promotors des humanen Insulingens untersucht werden. Zusätzlich wurde analysiert, welchen Effekt die DLK auf die transkriptionelle Aktivität von MafA und seinen Mutanten nach deren Rekrutierung an den Promotor des humanen Insulingens hat. Dazu wurden transiente Transfektionen in JEG-Zellen durchgeführt, die kein endogenes MafA besitzen.

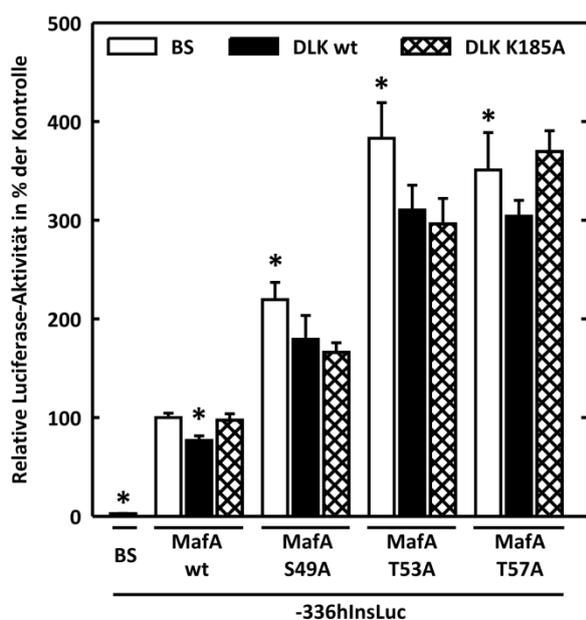
Die folgenden Plasmide wurden transfiziert (s. Abb. 3.6 A): das Luciferasereportergen unter der Kontrolle des Promotors des humanen Insulingens und Expressionsvektoren für DLK wt, DLK K185A, sowie verschiedene MafA-Punkt-Mutanten. In der ersten Gruppe der Experimente (s. Abb. 3.6 B) wurden der MafA wt und die Mutanten MafA S49A (Serin mutiert zu Alanin), MafA T53A und T57A transfiziert. In der zweiten Gruppe (s. Abb. 3.6 C) wurden MafA wt und die Mutanten MafA S61A, S65A und MafA 4A (AS 49, 53, 57 und 61 zu Alanin mutiert) transfiziert.

Aus Abb. 3.6 B und C ist ersichtlich, dass eine Insulingentranskription in JEG-Zellen kaum nachweisbar war (jeweils linke Säule), erst die Überexpression von MafA wt und seiner Rekrutierung an den Promotor des humanen Insulingens steigerte die transkriptionelle Aktivität des Promotors. Die Aktivität bei Überexpression der MafA-Mutanten war im Vergleich zur Kontrolle (MafA wt) erhöht, je weiter C-terminal innerhalb von MafA die Mutation lag (weiße Säule). Überexpression von DLK wt verminderte in der ersten Gruppe (s. Abb. 3.6 B) die Luciferaseaktivität um ein Viertel von $100 \% \pm 4,5$ auf $76,8 \% \pm 4,8$. Bei Überexpression von DLK K185A war der inhibitorische Effekt nicht nachweisbar ($97,4 \% \pm 6,5$). Auch in der zweiten Gruppe (s. Abb. 3.6 C) bestätigte sich dies (BS: $100 \% \pm 5,6$; DLK wt $55,9 \% \pm 7,6$; DLK K185A $94,6 \% \pm 5,2$). Der hemmende Effekt der DLK ließ sich nur bei Überexpression des MafA wt nachweisen, bei den MafA-Mutanten war keine Hemmung der transkriptionellen Aktivität durch den DLK wt detektierbar.

A



B



C

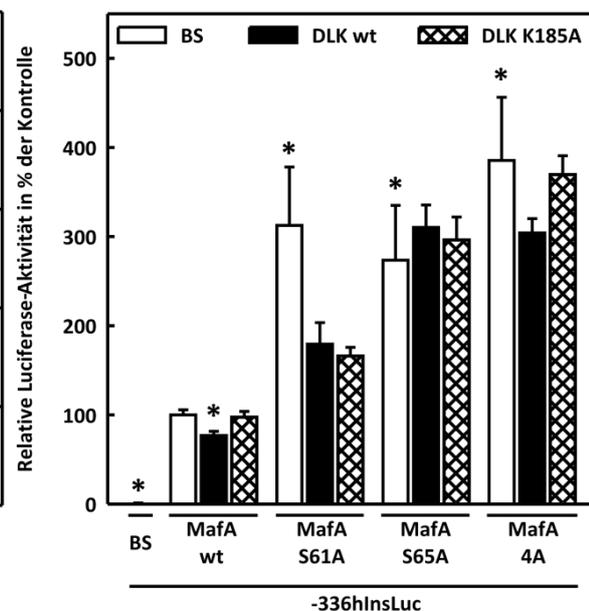


Abb. 3.6: Wirkung von DLK auf die MafA-Mutanten-abhängige Insuligentranskription in der Nicht- β -Zelllinie JEG.

A Verwendete Expressionsplasmide und das Reporterengenkonstrukt. **B** JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporterengenplasmid -336hInsLuc. Cotransfiziert wurden Expressionsvektoren für BS (Kontrolle), DLK wt, DLK K185A, MafA wt, MafA S49A, MafA T53A und MafA T57A sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=8). * $p \leq 0,05$ (t-Test). **C** JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit dem Reporterengenplasmid -336hInsLuc. Cotransfiziert wurden Expressionsvektoren für BS (Kontrolle), DLK wt, DLK K185A, MafA wt, MafA S61A, MafA S65A und MafA 4A sowie GFPtpz. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und ein Luciferaseassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als RLU, korreliert mit der GFP-Aktivität, relativ zum Mittelwert der Kontrolle. Abgebildet sind Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.3. Halbwertszeit von DLK und MafA in der β -Zelllinie HIT

Um herauszufinden, welche Halbwertszeit endogene DLK und endogenes MafA in HIT-T15-Zellen haben, wurden die Zellen mit dem Translationshemmstoff Cycloheximid (50 $\mu\text{g/ml}$) für zunehmende Zeiträume inkubiert. Anschließend wurde im Zelllysate mittels Western Blot Analyse der Gehalt an MafA und DLK detektiert und mit dem Gehalt an GAPDH korreliert. Dazu wurde ein DLK-spezifischer Antikörper (DLK migriert bei 130 kDa) zum Nachweis von endogener DLK eingesetzt, ein MafA-spezifischer Antikörper (MafA migriert bei 47 kDa) diente dem Nachweis von endogenem MafA und ein GAPDH-spezifischer Antikörper (GAPDH migriert bei 37 kDa) wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinauftragung verwendet. Als Ausgangswert dienten jeweils unbehandelte Zellen.

Abb. 3.7 A und B zeigen typische Western-Blot-Bilder, Abb. 3.7 C und D die densitometrische Auswertung der DLK- bzw. MafA-Bandendichte. Durch die Cycloheximid-Behandlung wird die Proteinmenge von DLK und MafA vermindert. Der Zeitraum, in welchem eine Behandlung mit Cycloheximid zu einer Reduktion des Gehaltes an endogener DLK bzw. endogenem MafA um 50 % führt, kann vereinfachend als Halbwertszeit beschrieben werden. Nach Exploration der Daten besitzt DLK in HIT-T15-Zellen eine Halbwertszeit von 2,5 h und MafA hat eine Halbwertszeit von 6 h.

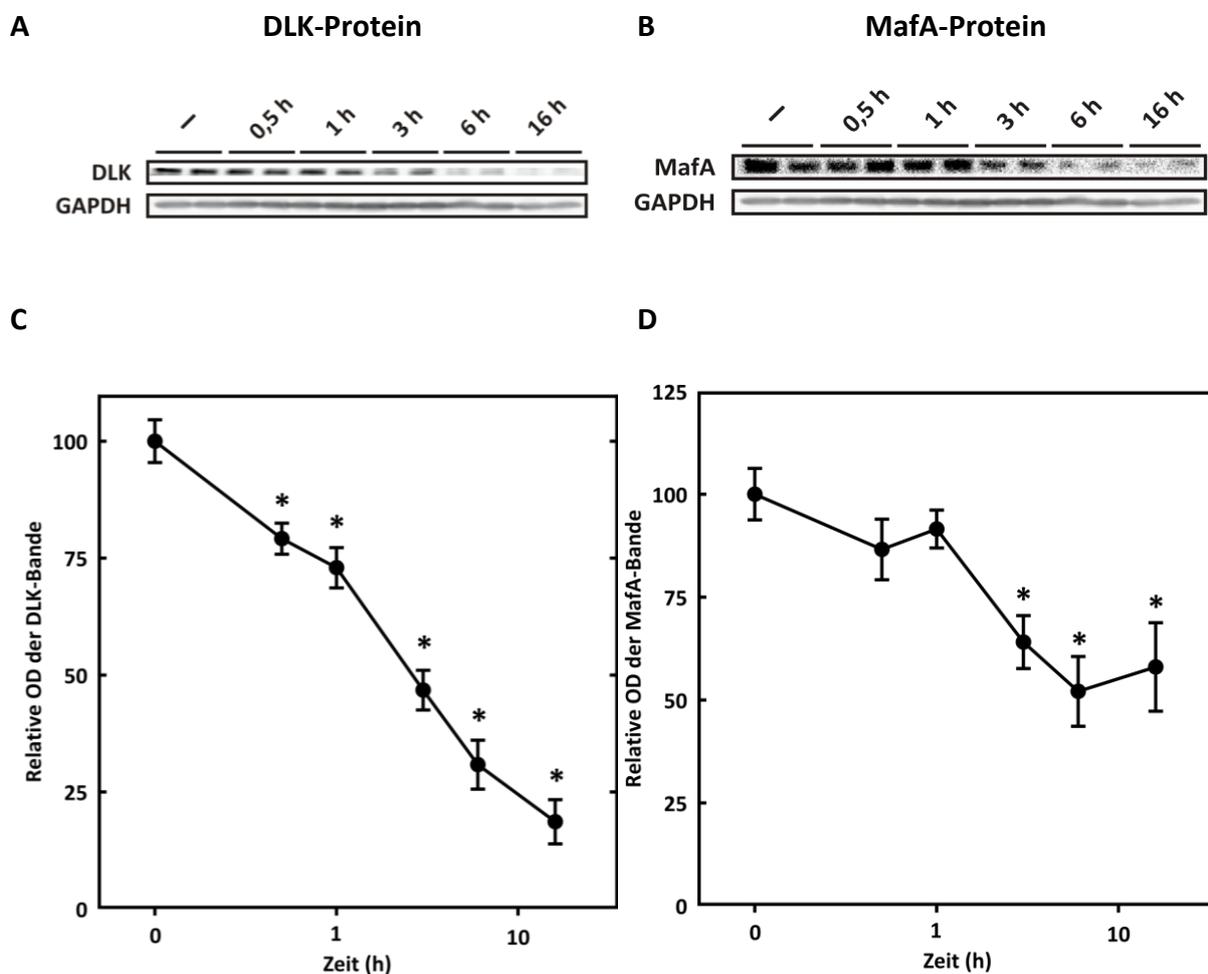


Abb. 3.7: Zeitabhängige Wirkung von Cycloheximid auf die DLK- und MafA-Proteinmenge in der β -Zelllinie HIT.

A Repräsentativer Western Blot mit DLK-Detektion (130 kDa) und GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 μ g Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **B** Repräsentativer Western Blot mit MafA-Detektion (47 kDa) und GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 μ g Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **C** Quantitative Auswertung der DLK-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. HIT-T15-Zellen wurden ausplattiert und nach 48 h geerntet. Jeweils 16, 6, 3, 1 bzw. 0,5 h vor der Ernte wurden die Zellen mit Cycloheximid (50 μ g/ml) behandelt. Die Kontrolle (Ausgangswert) wurde nicht behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). Das Diagramm zeigt die relative optische Dichte von DLK in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test), jeweils in Bezug zur Kontrolle. **D** Quantitative Auswertung der MafA-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. HIT-T15-Zellen wurden ausplattiert und nach 48 h geerntet. Jeweils 16, 6, 3, 1 bzw. 0,5 h vor der Ernte wurden die Zellen mit Cycloheximid in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml behandelt. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). Das Diagramm zeigt die relative optische Dichte von MafA in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test), jeweils in Bezug zur Kontrolle (Ausgangswert).

3.4. Wirkung von DLK auf die Proteinstabilität von MafA

3.4.1. Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge

Um die Wirkung von DLK auf die Proteinmenge von MafA zu untersuchen, wurden DLK wt, DLK K185A und MafA in Nicht- β -Zellen (JEG-Zellen) überexprimiert bzw. die jeweiligen Plasmide transfiziert. Es wurden vier Gruppen in Doppelbestimmung wie in Abb. 3.8 A angegeben transfiziert: In der ersten Gruppe wurde nur der Leervektor BS als Kontrolle transfiziert, in den anderen Gruppen wurde jeweils MafA zusammen mit BS (zweite Gruppe) bzw. DLK wt (dritte Gruppe) bzw. DLK K185A (vierte Gruppe) überexprimiert.

Nach der Zellernte wurde das Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde ein DLK-spezifischer Antikörper zum Nachweis von überexprimiertem DLK eingesetzt, ein MafA-spezifischer Antikörper diente dem Nachweis von überexprimiertem MafA, und ein GAPDH-spezifischer Antikörper wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinladung verwendet.

Abb. 3.8 A demonstriert einen typischen Western Blot mit den DLK-, MafA- und GAPDH-repräsentierenden Proteinbanden. Abb. 3.8 B zeigt die densitometrische Auswertung der MafA-repräsentierenden Banden. Überexpression von MafA führte zu einer deutlichen Zunahme der MafA-repräsentierenden Bande im Western Blot im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor BS in Gruppe eins ($p=0,00003$). Ebenso führt die DLK-Überexpression zu einer deutlichen Zunahme der DLK-repräsentierenden Bande (Abb. 3.8 A oben). Dies waren notwendige Kontrollen, denn sie bestätigen, dass in JEG-Zellen kein endogenes MafA und keine endogene DLK nachweisbar sind. Bei gleichzeitiger Überexpression von DLK wt nahm die Dichte der MafA-repräsentierenden Bande um ein Drittel ab (von $100\% \pm 4,5$ auf $65,7\% \pm 2,3$). Bei Überexpression der Kinase-inaktiven Mutante der DLK K185A war eine verminderte Wirkung auf die Dichte der MafA-Bande nicht mehr nachweisbar.

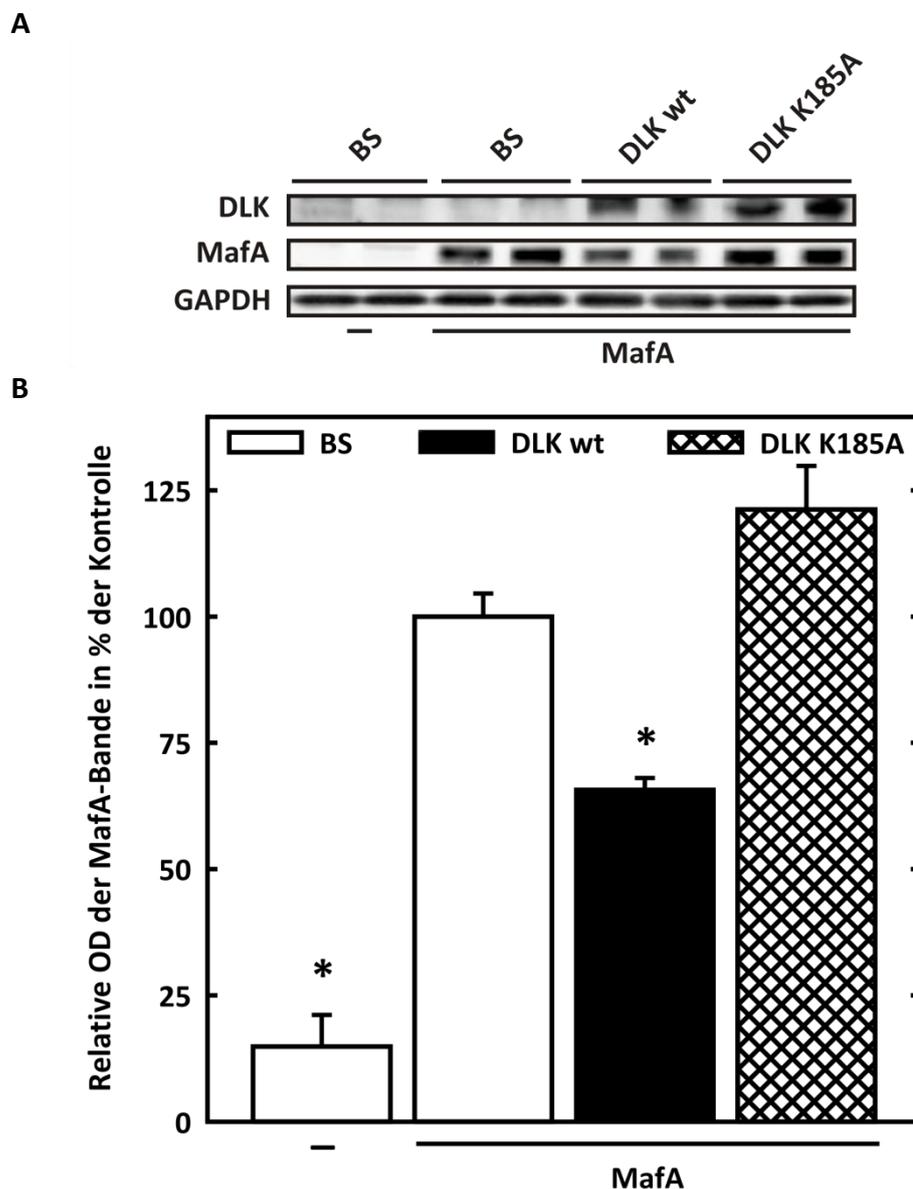


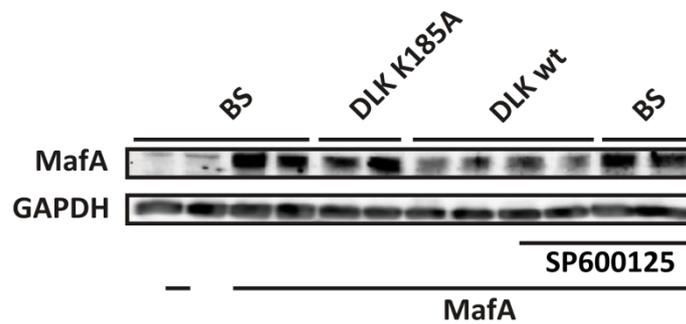
Abb. 3.8: Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge.

A Repräsentativer Western Blot mit DLK-Detektion (130 kDa), MafA-Detektion (47 kDa) und GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 μ g Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **B** Quantitative Auswertung der MafA-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit den Expressionsvektoren BS (Leervektor), MafA wt, DLK wt und DLK K185A und nach 48 h geerntet. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=4). Das Diagramm zeigt, in Bezug zur Kontrolle BS (zweite Säule), die relative optische Dichte von MafA in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.4.2. Wirkung von DLK wt und DLK K185A auf die MafA-Proteinmenge bei zusätzlicher Behandlung mit dem JNK-Inhibitor

Um die Wirkung von DLK und die ihr untergeordneten Kinase JNK auf die Proteinmenge von MafA zu untersuchen, wurden DLK wt und DLK K185A und MafA in der Nicht- β -Zelllinie JEG überexprimiert und einige Gruppen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt. Es wurden sechs Gruppen jeweils in Doppelbestimmung definiert, welche Abb. 3.9 A entnommen werden können: In der ersten Gruppe wurde zur Kontrolle BS überexprimiert. In alle fünf weiteren Gruppen wurde jeweils MafA, und zusätzlich BS (Gruppe zwei und sechs) bzw. DLK K185A (Gruppe drei) bzw. DLK wt (Gruppe vier und fünf) überexprimiert. Die Zellen der Gruppe fünf und sechs wurden wie angegeben 16 h vor der Ernte mit dem JNK-Inhibitor SP600125 in einer Endkonzentration von 25 μ M behandelt. Nach der Zellernte wurde das Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden ein MafA-spezifischer Antikörper und ein GAPDH-spezifischer Antikörper verwendet. Abb. 3.9 A zeigt typische Western Blot Bilder. In den Western-Blot-Bildern und der densitometrischen Auswertung der MafA-Bande (Abb. 3.9 B) ist zu erkennen, dass bei Überexpression von MafA eine Zunahme der MafA-repräsentierenden Bande detektierbar war. Die MafA-Bandenintensität wurde bei zusätzlicher Überexpression von DLK wt um ein Drittel reduziert (von $100\% \pm 3,1$ auf $64\% \pm 5,8$). Diese verminderte Bandenintensität war bei Überexpression von DLK K185A nicht vorhanden. Diese drei Beobachtungen entsprechen ihrer Aussage nach denen aus Abb. 3.8. Wurden die Zellen jedoch zusätzlich mit dem JNK-Inhibitor behandelt, so zeigt sich, dass die DLK-induzierte Verminderung der Bandenintensität von MafA nicht mehr nachweisbar war (von $64\% \pm 5,8$ ohne JNK-Inhibitor auf $92\% \pm 9,7$ mit JNK-Inhibitor).

A



B

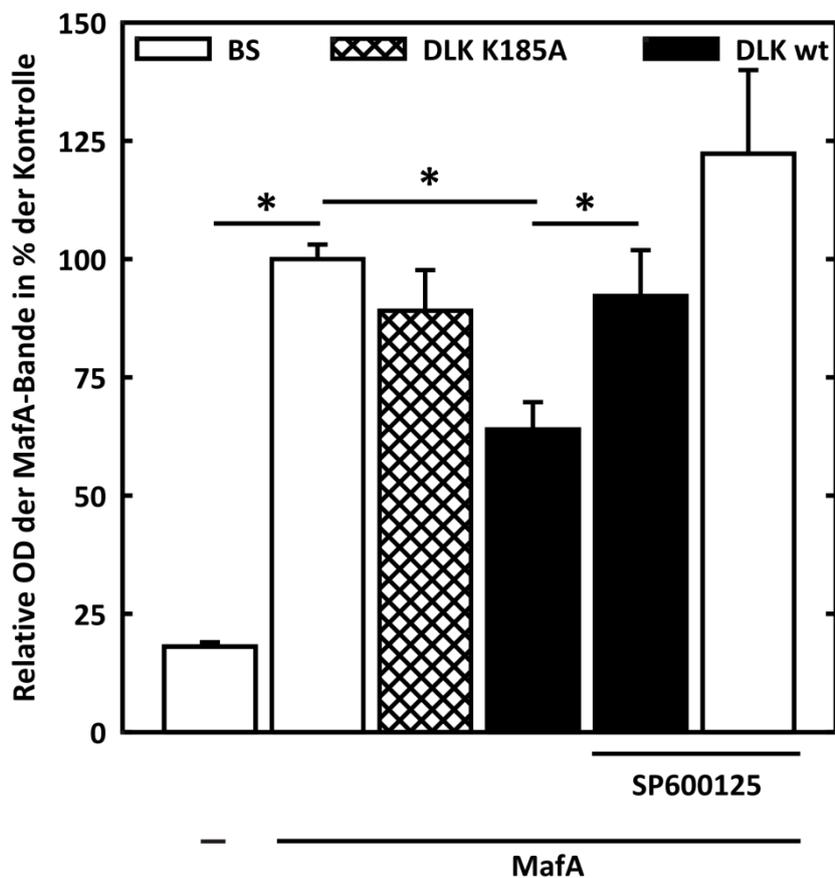


Abb. 3.9: Wirkung von DLK auf die MafA-Proteinmenge bei zusätzlicher Behandlung mit dem JNK-Inhibitor.

A Repräsentativer Western Blot mit anti-MafA-Detektion (47 kDa) und anti-GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 µg Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **B** Quantitative Auswertung der MafA-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit den Expressionsvektoren BS (Leervektor), MafA wt, DLK wt und DLK K185A und nach 48 h geerntet. Jeweils 16 h vor der Ernte wurden zwei Gruppen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 in einer Endkonzentration von 25 µM behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). Das Diagramm zeigt, in Bezug zur Kontrolle, die relative optische Dichte von MafA in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.4.3. Wirkung von DLK und JNK-Inhibitor auf die Phosphorylierung von JNK

Eine Aktivierung der DLK führt zu einer vermehrten Phosphorylierung und Aktivierung der ihr untergeordneten Kinase JNK. Es sollte untersucht werden, ob JNK an der DLK-induzierten Verminderung der MafA-Proteinmenge beteiligt ist. Dazu wurde ein JNK-spezifischer Inhibitor (SP600125) verwendet, der die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von JNK hemmt (Bennett et al. 2001). Um die Spezifität des JNK-Inhibitors zu kontrollieren, wurde bei den Western Blots mit JNK-Inhibitor (siehe 3.4.2) eine Analyse des JNK- und Phospho-JNK-Proteingehaltes durchgeführt. Dazu wurden ein JNK-Antikörper und ein phosphorylierungsspezifischer JNK-Antikörper verwendet. Es ist bekannt, dass JNK in zwei Banden im Western Blot migriert (46 und 54 kDa) (Hibi et al. 1993). Dies resultiert aus Prozessierung bzw. alternativem Spleißen der mRNA-Transkripte von JNK (Gupta et al. 1996).

Die Nicht- β -Zelllinie JEG wurde wie aus Abb. 3.10 A ersichtlich in sechs Gruppen in Doppelbestimmung transient transfiziert: die erste Gruppe wurde nur mit dem Leervektor BS, die zweite Gruppe zusätzlich mit MafA transfiziert. Gruppen drei bis sechs wurden jeweils mit MafA und zusätzlich mit DLK K185A bzw. DLK wt bzw. BS transfiziert, wobei Gruppe fünf und sechs 16 h vor der Zellernte mit dem JNK-Inhibitor SP600125 behandelt wurden.

Der Western Blot in Abb. 3.10 A zeigt, dass JNK in JEG-Zellen gleichmäßig exprimiert wird. Bei Behandlung der Zellen mit dem JNK-Inhibitor vermindert sich die Dichte der Phospho-JNK-repräsentierenden Bande. Die densitometrische Auswertung der Phospho-JNK Bande relativ zur JNK-Bande (Abb. 3.10 B) ergab eine verstärkte Phosphorylierung von JNK bei zusätzlicher Überexpression von DLK wt ($156,4\% \pm 11,2$), welche bei Überexpression von DLK K185A ($125,4\% \pm 12,4$) nicht so ausgeprägt war im Vergleich zur Kontrollgruppe ($100\% \pm 13,4$). Diese um den Faktor 1,5 verstärkte JNK-Phosphorylierung bei DLK-Überexpression passt zu der oben beschriebenen Wirkung von DLK auf JNK, war jedoch aufgrund der geringen n-Zahl nicht signifikant ($p = 0,1$). Außerdem zeigte sich in der fünften und sechsten Gruppe, dass bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit dem JNK-Inhibitor die Dichte der Phospho-JNK-repräsentierenden Banden auf ein Fünftel vermindert wurde (auf $34,7\% \pm 4,1$ bzw. $7,8\% \pm 0,9$).

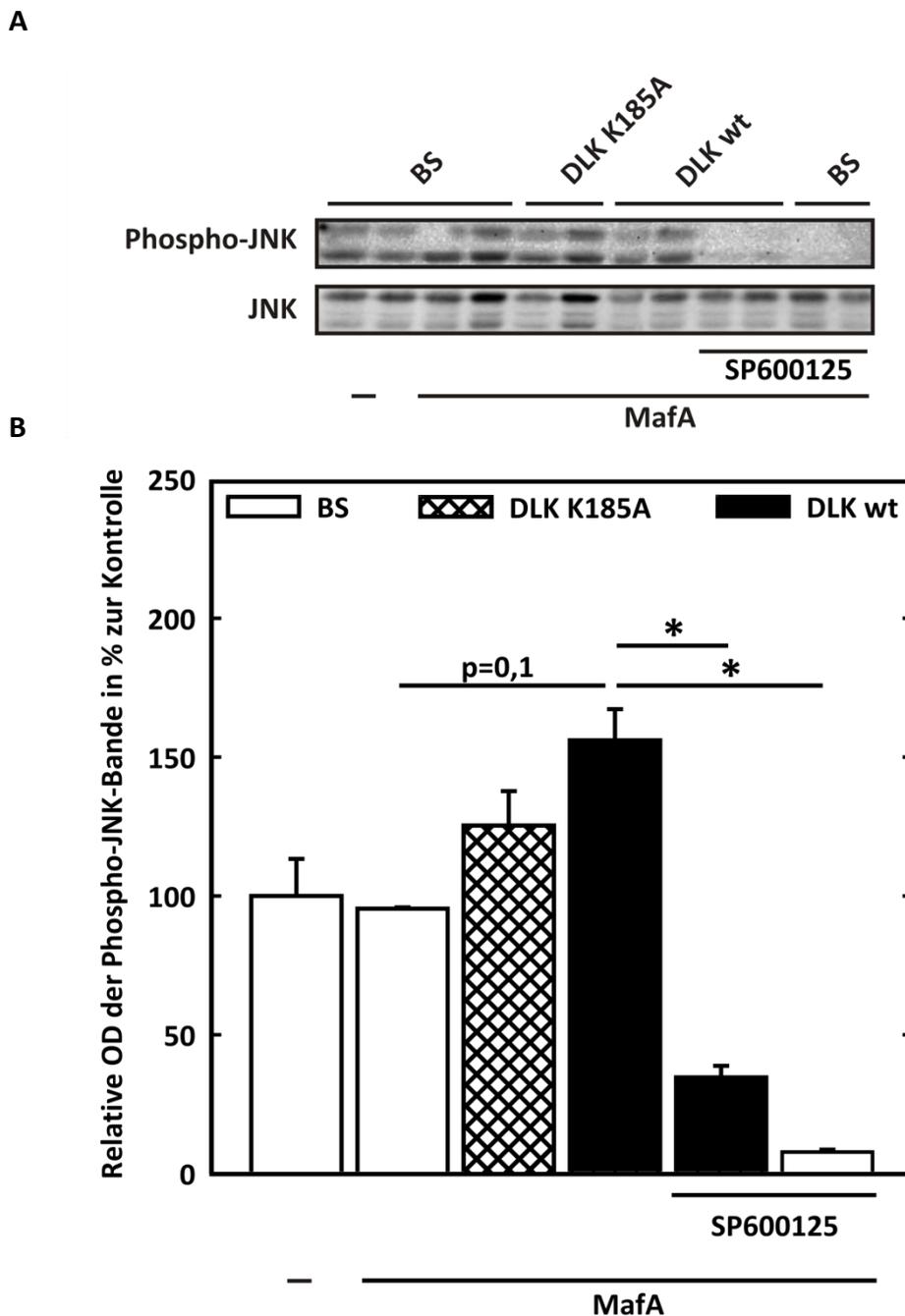


Abb. 3.10: Wirkung von DLK und JNK-Inhibitor auf die Phosphorylierung von JNK.

A Western Blot mit JNK-Detektion (46 und 57 kDa) und Phospho-JNK-Detektion (46 und 57 kDa). 200 µg Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **B** Quantitative Auswertung der Phospho-JNK-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur JNK-Menge. JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit den Expressionsvektoren BS (Leervektor), MafA wt, DLK wt und DLK K185A und nach 48 h geerntet. Jeweils 16 h vor der Ernte wurden zwei Gruppen mit dem JNK-Inhibitor SP600125 in einer Endkonzentration von 25 µM behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM aus einem unabhängigen Versuch in Doppelbestimmung (n=2). Das Diagramm zeigt, in Bezug zur Kontrolle, die relative optische Dichte von Phospho-JNK in den jeweiligen Gruppen. * p ≤ 0,05 (t-Test).

3.5. Wirkung von Proteasominhibitoren auf die Proteinstabilität von DLK und MafA in der Nicht- β -Zelllinie JEG

Die folgenden Ergebnisse dienen der Beantwortung der Frage, wie die Proteinstabilität von DLK und MafA reguliert wird. Eine mögliche Regulation des Abbaus von Proteinen ist die proteasomale Degradation.

Dazu wurde die Nicht- β -Zelllinie JEG mit den jeweiligen Expressionsvektoren für DLK wt, MafA bzw. BS (Leervektor) transient transfiziert (s. Abb. 3.11.) Jeweils 16 h vor der Zellernte wurden einzelne Gruppen mit den strukturell unterschiedlichen Proteasominhibitoren Lactacystin (10 μ M) und Epoxomicin (0,5 μ M) behandelt.

Nach der Zellernte wurde das Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden ein DLK-spezifischer Antikörper zur Detektion von DLK, ein MafA-spezifischer Antikörper zur Detektion von MafA und ein GAPDH-spezifischer Antikörper zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinladung verwendet.

Wie den repräsentativen Western-Blot-Bildern und der densitometrischen Auswertung der Proteinbanden von DLK und MafA in Abb. 3.11 zu entnehmen ist, war im Vergleich zur Überexpression des Leervektors BS zunächst eine deutlich vermehrte Bandenintensität bei Überexpression von DLK wt bzw. von MafA zu erkennen, wodurch bestätigt wird, dass in JEG-Zellen kein endogenes MafA nachweisbar ist. Aus Abb. 3.11 A und C ist zu entnehmen, dass die DLK-repräsentierende Bande bei zusätzlicher Behandlung mit Lactacystin nicht an Intensität zunahm, bei Behandlung mit Epoxomicin kam es jedoch zu einer ca. 9-fach erhöhten Menge an DLK. Dies lässt Rückschlüsse auf eine vermehrte Hemmung des Abbaus der DLK durch Epoxomicin zu. Abb. 3.11 B und D ist zu entnehmen, dass Lactacystin auf die MafA-Proteinmenge keinen deutlichen Einfluss hat, was auch nicht durch zusätzliche Überexpression von DLK wt veränderlich ist. Zu einer deutlichen Steigerung der MafA-Bandenintensität kam es bei Behandlung mit Epoxomicin, um das 8-fache bei alleiniger MafA-Überexpression und um das 6-fache bei MafA- und DLK-Überexpression.

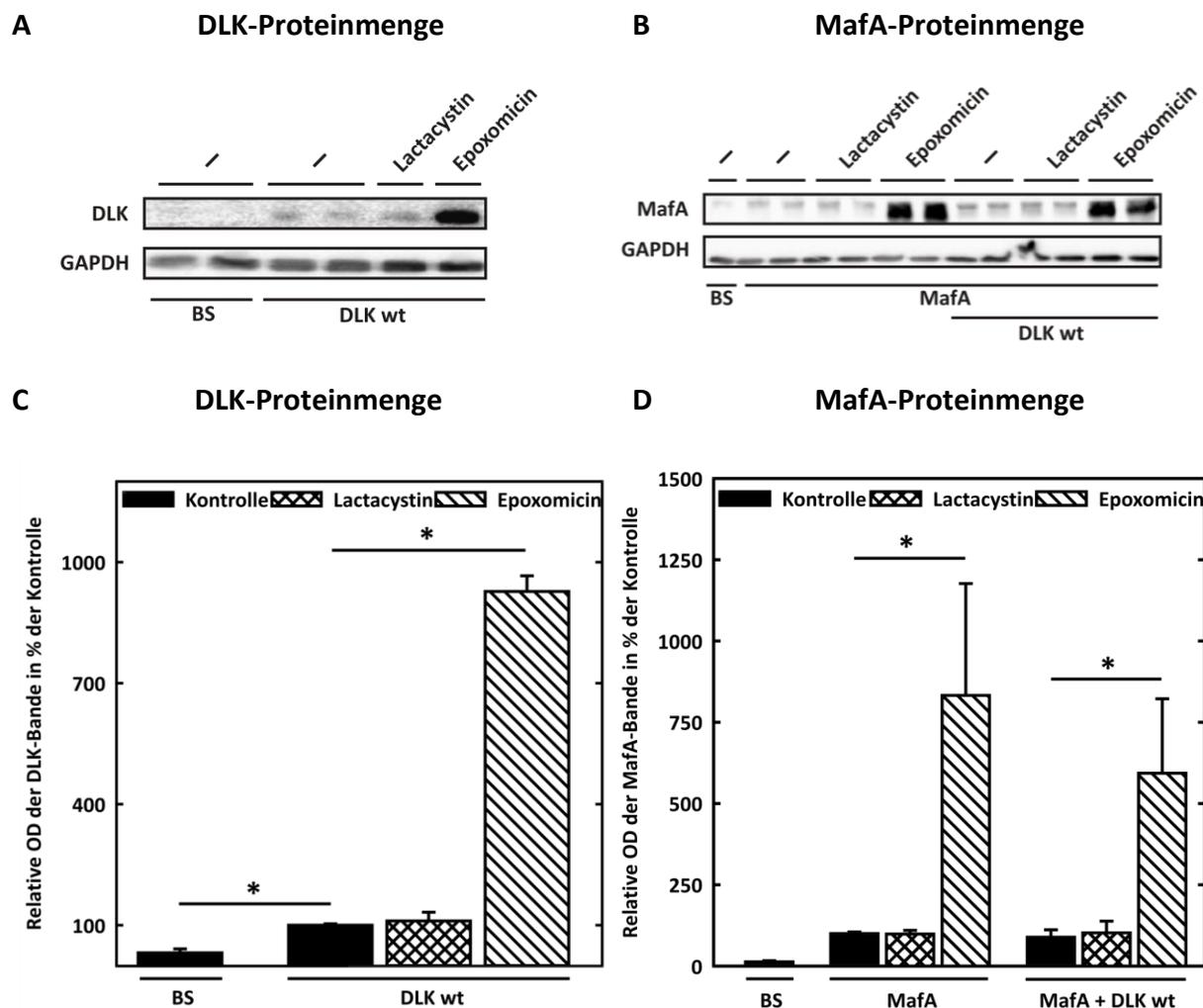


Abb. 3.11: Wirkung von Lactacystin und Epoxomicin auf die DLK- und MafA-Proteinmenge.

A Repräsentativer Western Blot mit DLK-Detektion (130 kDa) und GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 µg Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **B** Repräsentativer Western Blot mit MafA-Detektion (47 kDa) und GAPDH-Detektion (37 kDa). 200 µg Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. **C** Quantitative Auswertung der DLK-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit den Expressionsvektoren BS (Leervektor) und DLK wt und nach 48 h geerntet. Jeweils 16 h vor der Ernte wurde eine Gruppe mit dem Proteasominhibitor Lactacystin (Endkonzentration 10 µM) und eine Gruppe mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin (Endkonzentration 0,5 µM) behandelt. Die Kontrollen wurden nicht behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte mit ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen in Einfach- und Doppelbestimmung (n=3 bzw. 6). Das Diagramm zeigt, in Bezug zur Kontrolle, die relative optische Dichte von DLK in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test). **D** Quantitative Auswertung der MafA-Menge in Prozent zur Kontrolle, korreliert zur GAPDH-Menge. JEG-Zellen wurden transient transfiziert mit den Expressionsvektoren BS (Leervektor), DLK wt und MafA wt und nach 48 h geerntet. Jeweils 16 h vor der Ernte wurde eine Gruppe mit dem Proteasominhibitor Lactacystin (Endkonzentration 10 µM) und eine Gruppe mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin (Endkonzentration 0,5 µM) behandelt. Die Kontrollen wurden nicht behandelt. Abgebildet sind Mittelwerte mit ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen jeweils in Doppelbestimmung (n=6). Das Diagramm zeigt, in Bezug zur Kontrolle, die relative optische Dichte von DLK in den jeweiligen Gruppen. * $p \leq 0,05$ (t-Test).

3.6. Herstellung von DLK wt- und DLK K185A-Adenoviren

3.6.1. Übersicht

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es gewesen, für weiterführende Experimente zwei Arbeitsschritte auf dem Weg der Herstellung zweier rekombinanter, replikationsdefizienter Adenoviren für die Expression von DLK wt und DLK K185A zu leisten.

Die herzustellenden Viren sind rekombinante humane Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5), welche ca. 10 bis 90 nm groß sind, ein Genom von 36 kb doppelsträngiger DNA besitzen und DLK wt oder DLK K185A exprimieren. Sie wurden nach der Methode von He et al. (1998) und Luo et al. (2007) hergestellt.

Die transgene DNA (hier DLK wt bzw. DLK K185A) wurde zunächst in den pAd-Track-CMV-Vektor als Transfervektor hinein kloniert (s. 2.5), da eine direkte Klonierung in das Virus-Genom nicht möglich ist. Der Transfervektor besitzt eine *multiple cloning site*, in welche die DNA mithilfe von geeigneten Restriktionsschnittstellen hinein kloniert werden konnte. Die *multiple cloning site* ist von zwei homologen Armen flankiert, die die homologe Rekombination mit pAd-Easy-1 erlauben. Der pAd-Track-CMV-Vektor besitzt ein Kanamycin-Resistenz-Gen, eine Expressionskassette für GFP und einen CMV-Promotor für die Expression der Zielsequenz (DLK). Die erfolgreiche Klonierung von pAdTrack-CMV-DLK wurde überprüft (s. 3.6.2).

Das pAd-Easy-1-Adenovirus-Plasmid besitzt das gesamte Adenovirus-Genom außer denjenigen Nukleotiden, die für die E1 und E3 Gene kodieren ($\Delta E1$, $\Delta E3$); damit ist das Virus replikationsdefizient. Das pAd-Easy-1-Adenovirus-Plasmid ist in elektrisch kompetenten BJ5183-E.coli Zellen (Ad-Easier Zellen) verpackt. Die homologe Rekombination zwischen dem linearisierten Transfervektor pAd-Track-CMV-DLK und dem Zielplasmid pAd-Easy-1 fand durch Elektroporation von pAd-Track-CMV-DLK mit den AdEasier-Zellen statt. Das rekombinante adenovirale Plasmid, welches dabei neu entstand, wurde pAd-DLK genannt und ist replikationsdefizient.

Das pAd-DLK-Plasmid wurde in HEK-293A-Zellen transfiziert. HEK-293A können als sog. Verpackungszellen die Deletion von E1-kodierenden Genen im pAd-DLK ausgleichen durch Expression von Selbigen (Luo et al. 2007), und das Virus kann sich innerhalb der HEK-293A-Zellen amplifizieren (E3 ist nicht essentiell für die Virusproduktion). Mittels GFP-Detektion kann die Virusamplifikation mikroskopisch kontrolliert werden. Nach 14 bis 20 Tagen können die Zellen geerntet und das Virus mithilfe eines Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt werden. Dieser dritte Schritt der Virusherstellung wurde von Kollegen in der Arbeitsgruppe übernommen.

3.6.2. Sequenzierung, Überexpression, Fluoreszenzkontrolle und Western Blot von pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A

Um die genaue Nukleotidabfolge der klonierten Plasmide pAdTrack-CMV-DLK wt und pAdTrack-CMV-DLK K185A am Übergang zwischen Vektor und Insert (DLK) zu kontrollieren und die Mutation an Aminosäure 185 zu überprüfen, wurden beide Konstrukte sequenziert. Dazu wurde ein *reverse* Primer verwendet, dessen komplementärer DNA Strang für einen Bereich innerhalb des pAd-Track-CMV-Vektors codiert und der bei der PCR die *template* DNA bis weit in die DLK hinein amplifiziert. Der *forward* Primer amplifizierte *template* DNA in der PCR, die weiter 5' hinter der Mutationsstelle an AS 185 lag.



Abb. 3.12: Sequenzierung von pAdTrack-CMV-DLK.

Als *template* für die Sequenzierung dient die DLK (wt bzw. K185) (orange), eingefügt in den pAdTrack Vektor (blau). Die grünen Pfeile symbolisieren *forward* (F) und *reverse* (R) Primer. Zur Orientierung sind die Restriktionsschnittstellen innerhalb der *template* DNA angegeben.

DLK wt	5'	GTG AAG AAG GTT CGA GAT CTC AAG	3'
DLK K185A	5'	GTG GCG AAG GTT CGA GAT CTC AAG	3'

Abb. 3.13: Nukleotidabfolge AS 184-191 von DLK wt und DLK K185A nach der Sequenzierung.

Die von Lysin zu Alanin mutierte AS 185 ist rot dargestellt.

Die Klonierung der pAdTrack-DLK wt und pAdTrack-DLK K185A Konstrukte war erfolgreich. Der Übergang von Vektor in Insert war korrekt, und die Mutation im Konstrukt pAd-Track-CMV-DLK K185A war erhalten. Da nicht die kompletten Konstrukte per Sequenzierung überprüft worden sind, wurden diese zur Sicherheit zusätzlich transient in HEK-293A-Zellen transfiziert. Der Vektor pAdTrack-CMV enthält eine GFP-Expressionskassette, sodass mithilfe der GFP-Fluoreszenzmikroskopie die Transfektionseffizienz nachgewiesen werden kann (s. 2.7.3, S. 103). Es wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden verwendet: Bei der METAFECTENE™-Methode waren mehr Zellen transfiziert als bei der Lipofectamine™2000-Methode (s. Abb. 3.14).

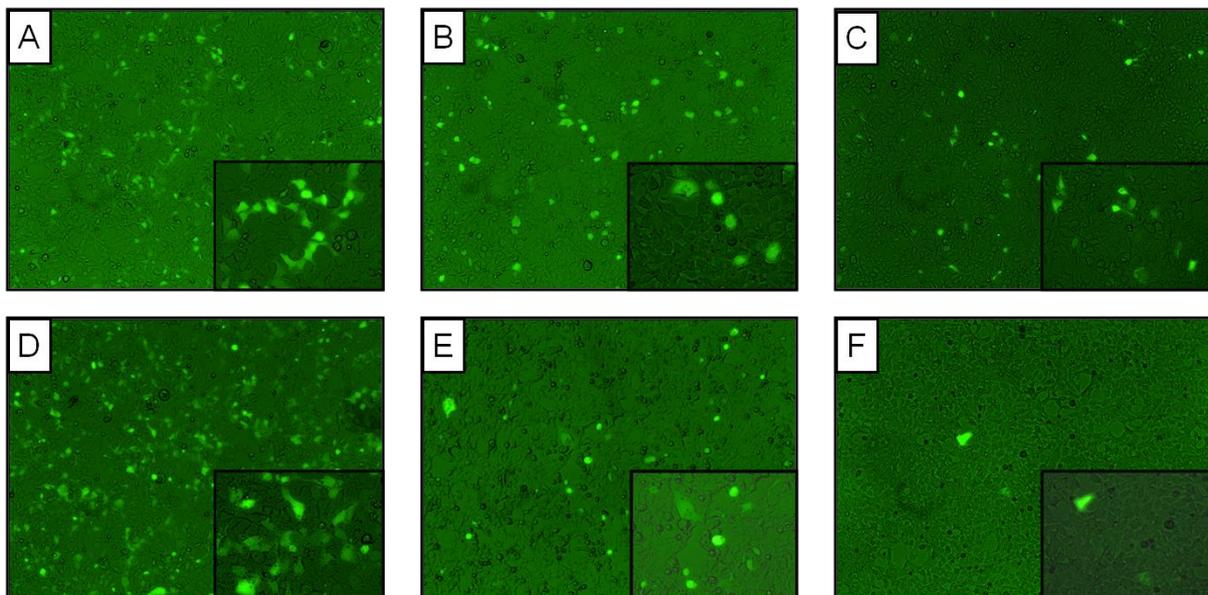


Abb. 3.14: Fluoreszenz von pAdTrack-CMV-transfizierten HEK-293A-Zellen.

A - F HEK-293A-Zellen wurden ausplattiert und nach 18 h transfiziert mit 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Transfektionsreagenz. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen entstanden 48 h nach der Transfektion. **A - C** Nach der METAFECTENE™-Methode transfizierte Zellen. **D - F** Nach der Lipofectamine™2000-Methode transfizierte Zellen. **A, D** Überexpression von pAdTrack-CMV (Leervektor). **B, E** Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK wt. **C, F** Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK K185A.

Nach der Zellernte wurde ein Western Blot durchgeführt, um die überexprimierte DLK nachzuweisen. Wie aus Abb. 3.15 ersichtlich, war bei Überexpression des Leervektors pAdTrack-CMV kein DLK-Protein detektierbar (A, D). Bei Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK wt war eine deutliche DLK Bande nachweisbar (B, E), wobei die Transfektionseffizienz bei der METAFECTENE™-Methode besser war (analog zu Abb. 3.14). Bei Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK K185A war ebenfalls eine starke DLK Bande nachweisbar (C, F), wobei

auch hier die Transfektionseffizienz bei der METAFECTENE™-Methode höher war (analog zu Abb. 3.14). Die Bande vom DLK wt erscheint als Doppelbande, die Bande der Mutante DLK K185A erscheint als Einfachbande.

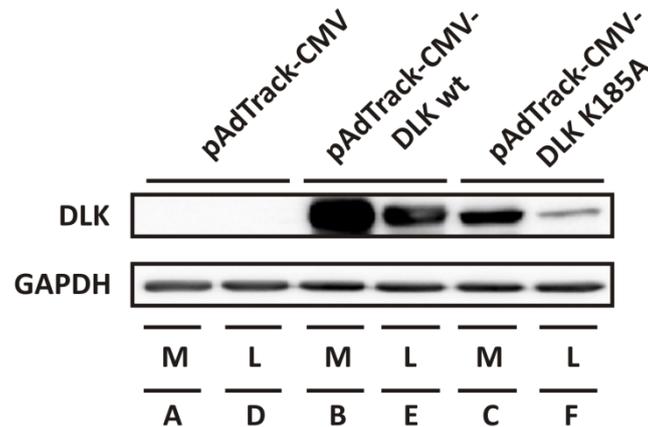


Abb. 3.15: Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK-wt- und pAdTrack-CMV-DLK-K185A-transfizierten HEK-293A-Zellen. A - F HEK-293A-Zellen wurden ausplattiert und nach 18 h transfiziert mit 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Transfektionsreagenz. Ernte für den Western Blot: 24 nach der Transfektion. 300 µg Protein wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. A, B, C Nach der METAFECTENE™-Methode (M) transfizierte Zellen. D, E, F Nach der Lipofectamine™2000-Methode (L) transfizierte Zellen. A, D: Überexpression von pAdTrack-CMV (Leervektor als Kontrolle). B, E Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK wt. C, F Überexpression von pAdTrack-CMV-DLK K185A.

4. Diskussion

Der Diabetes mellitus ist eine gravierende Stoffwechselerkrankung, die eine besorgniserregende Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung entwickelt hat. Dementsprechend ist er ein wichtiger Gegenstand der medizinischen Forschung. Es ist bekannt, dass das Glucoseungleichgewicht, wie es beim Diabetes mellitus Typ 2 vorliegt, einerseits durch eine periphere Insulinresistenz und andererseits durch eine gestörte β -Zellfunktion entsteht und beides schon in frühen, noch nicht klinisch manifesten Stadien nachweisbar ist (Kahn et al. 2009). Der relative Insulinmangel beim Diabetes mellitus kann zunächst durch orale Antidiabetika ausgeglichen werden. So führen beispielsweise die blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe zu einer vermehrten Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen, indem sie über den SUR1-Rezeptor (*sulfonyl urea receptor*) den ATP-abhängigen einwärts gerichteten Kir6.2-Kaliumkanal schließen und daraufhin eine Membrandepolarisation zu einer Öffnung spannungabhängiger Calciumkanäle führt. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt eine Fusion von Insulin enthaltenen Speichervesikeln mit der Plasmamembran der β -Zellen und Insulin wird freigesetzt (Hersberger et al. 2009; Koepsell 2009).

Spätestens jedoch mit der Dekompensation der β -Zelle sind die oralen Antidiabetika nicht mehr ausreichend, um den relativen Insulinmangel auszugleichen. Es kommt zu einer vermehrten Apoptose der β -Zellen und zu einem Verlust an β -Zellfunktion im Sinne von verminderter Insulinbiosynthese und -sekretion (Kahn et al. 2009). Dabei hat die verminderte Insulinbiosynthese zwei Folgen: Es fehlt nicht nur Insulin für die Blutzuckersenkung, sondern auch für die Rückkopplung mit den β -Zellen. Diese besitzen Insulinrezeptoren, über die sie Auskunft über die im Blut zirkulierende Insulinmenge bekommen (Kulkarni et al. 1999). Spezifische pankreatische Knockoutmäuse, denen der Insulinrezeptor fehlt, weisen verminderte Insulinmengen im Blut und eine reduzierte β -Zellmasse auf (Kulkarni et al. 1999; Otani et al. 2004). Insulin wirkt demnach wie ein Wachstumsfaktor für die β -Zelle. Allein die Hemmung der Insulingentranskription kann schon die β -Zellmasse vermindern, was letztlich einen *circulus vitiosus* darstellt. Die Insulingentranskription nimmt daher eine bedeutende Stellung in der Pathogenese des Diabetes mellitus ein. Es existieren zahlreiche Faktoren, die

zur Entstehung des Diabetes mellitus beitragen. Bislang ist die intrazelluläre Signaltransduktion, die zum Verlust der β -Zell-Funktion führt, noch weitgehend unbekannt. Einige der Faktoren, die in der prädiabetischen Stoffwechsellage vermehrt sezerniert werden, sind proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1 β und TNF α (Maedler und Donath 2004; Donath et al. 2005; Lazar 2005). Sie aktivieren intrazelluläre Signalwege, zu denen auch die MAP-Kinasen zählen, welche die MAP-Kinase JNK aktivieren. Aktiviertes JNK spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus (Kaneto et al. 2002; Kaneto et al. 2005a). Die Rolle der der JNK übergeordneten Kinase MAPKKK DLK ist noch weitestgehend unbekannt. Die Dual-Leucine-Zipper-Kinase DLK aktiviert durch Phosphorylierung JNK (Hirai et al. 2006). Befunde unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass TNF α zu einer Aktivierung der DLK führt (unveröffentlicht). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die DLK zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB führt, welcher ein β -Zell-protektiver Transkriptionsfaktor ist (Oetjen et al. 2006). Auch MafA ist ein Transkriptionsfaktor, der eine enorme Bedeutung für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion hat. Eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von MafA führt zu verminderter Insulingentranskription (Oetjen et al. 2007). Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lieferten Hinweise auf eine durch die DLK vermittelte Hemmung des Transkriptionsfaktors MafA.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Wirkung der DLK auf MafA zu untersuchen. Dazu wurden Transfektionsstudien mit Hilfe von Reporterfusionsgenen durchgeführt. Die Reporterfusionsgene enthalten die zu untersuchenden Kontrollelemente und stellen bei Beachtung verschiedener Kontrollen eine einfache enzymatische Methode dar, mithilfe derer die transkriptionelle Aktivität eines Promotors gemessen werden kann. Die Expression des Reporters ist ein direktes Maß für die Funktion der untersuchten Promotorsequenz. Es wurde das Luciferase-Reportersystem verwendet, das schnell, ohne Radioaktivität und hintergrundfrei durchführbar war (De Wet et al. 1987). Außerdem wurde die Proteinanalytik verwendet, um den Mechanismus der DLK-induzierten Hemmung auf MafA zu spezifizieren. Mithilfe eines JNK-Inhibitors wurde untersucht, ob JNK an der DLK-induzierten MafA-Hemmung beteiligt ist. Eine mögliche proteasomale Degradation der Proteine DLK und MafA sowie die Halbwertszeit beider war Gegenstand näherer Betrachtungen.

4.1. HIT- und JEG-Zellen stellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Funktion der DLK dar

HIT-T15-Insulinoma-Zellen sind ein vielfach verwendetes und etabliertes *in-vitro*-System, um β -Zellmetabolismus und Insulinbiosynthese zu untersuchen (Santerre et al. 1981). Tumorzellen sind im Gegensatz zu primären Pankreasinselnzellen immortalisiert und eignen sich besonders, da sie eine hohe Teilungsrate besitzen und daher verfügbarer sind. Sie werden vielfach verwendet, um Transfektionsstudien und Proteincharakterisierungen durchzuführen. Vorteile von HIT-Zellen sind, dass sie wichtige Eigenschaften der ursprünglichen β -Zellen aufweisen wie die Synthese, Sezernierung und Speicherung von Insulin (Santerre et al. 1981). Expression von Kaliumkanälen und spannungsabhängigen Calciumkanälen machen sie elektrisch erregbar. Sie sind glucoseresponsiv und reagieren ebenso wie primäre β -Zellen bei Behandlung mit den als oralen Antidiabetika bekannten Sulfonylharnstoffen Glibenclamid und Tolbutamid mit einer Insulinfreisetzung (Ashcroft et al. 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Chorionkarzinom-Zelllinie JEG für Transfektionen genutzt, welche ebenfalls eine hormonproduzierende Tumorzelllinie darstellt. Sie ist hinsichtlich Handhabung und Verfügbarkeit vergleichbar mit HIT-Zellen, hat jedoch wenig Ähnlichkeit mit der β -Zelle und eignet sich besonders, um Effekte ohne Hintergrund unabhängig von endogen produziertem Insulin und endogenem DLK- und MafA-Protein zu untersuchen. Die MafA-abhängige Transkription des überexprimierten humanen Insulins wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe in JEG-Zellen charakterisiert (Oetjen et al. 2007) und auch andere Autoren fanden heraus, dass stabil transfiziertes MafA in einer Nicht- β -Zelllinie, welche normalerweise weder MafA noch Insulin exprimiert, selektiv die Insulinentranskription induziert (Matsuoka et al. 2004; Kaneto et al. 2005c). Die Befunde, die sich aus Experimenten in Nicht- β -Zelllinien ergeben, lassen sich unter Einschränkungen übertragen. Als nachteilig erweist sich bei Tumorzelllinien, dass sich die Zellen in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose von primären Zellen unterscheiden und die Ergebnisse aus *in-vitro*-Tumorzelllinien nur eingeschränkt interpretierbar sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Tumorzellen wegen ihrer physiologischen Eigenschaften gut als Modellsystem zur Erforschung der Pathogenese des Diabetes mellitus geeignet sind.

4.2. Adenoviraler Gentransfer als Möglichkeit erweiterter *in-vitro*-Untersuchungen

In den 1990er Jahren wurde die medizinische Forschung revolutioniert. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und dem Wissen vieler krankheitsassoziiertes molekularbiologischer Grundlagen und Funktionsweisen wurden erste erfolgsversprechende Phase-I-Experimente zu Gensatz und Genreparatur durchgeführt (Romano et al. 1999). Sie sind jedoch bislang meist nur theoretischer Natur geblieben. Aber nicht nur für die therapeutische Anwendung, auch für die molekulare Grundlagenforschung birgt das Einbringen eines Gens in eine normale oder kranke Zelle ein enormes Potential. Dabei existieren zwei Möglichkeiten, Fremd-DNA zu übertragen: Nicht-viral und viral. Die nichtvirale Übertragung, wozu auch die transiente Transfektion, Transformation und die Elektroporation zählen, ist zwar weniger effizient, aber wegen der guten Handhabung und der geringen Sicherheitsbedenken weit verbreitet. Die Vorteile des adenoviralen Gentransfers an primären Inseln gegenüber transienten Transfektionsstudien in Zellreihen sind, dass sich viel mehr Zelltypen behandeln lassen, die transgene Expression höher ist und sich die Zellen nicht teilen können müssen (He et al. 1998).

Um die in der vorliegenden Arbeit postulierten Mechanismen der DLK-induzierten MafA-Hemmung in primären β -Zellen auszuweiten, sollen innerhalb der Arbeitsgruppe Langerhans-Inseln von adulten Mäusen isoliert werden. Die Langerhans-Inseln bestehen zu ca. 80% aus β -Zellen, daher sind isolierte Inseln ein geeignetes Organ für Untersuchungen an primären β -Zellen. Die primären Inseln werden dann mit einem adenoviralen Vektor infiziert und die Proteine der Inselzellen können nach der Ernte mit Proteinen der nicht-infizierten Inselzellen hinsichtlich verschiedener Aspekte verglichen werden.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit einige der Teilschritte der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus für DLK wt und der Kinase-toten Mutante der DLK vorgenommen (s. Kap. 2.5, S. 54 und Kap. 3.6, S.101).

4.3. Die DLK führt zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors MafA

Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Reduktion des intrazellulären Gehaltes an DLK in HIT-Zellen in einer Stimulation der Transkription des humanen Insulins resultierte. Umgekehrt führte die Überexpression der DLK zu einer Hemmung der Insulinentranskription, wobei die Hemmung in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität der DLK erfolgte. Durch 5' und 3'-Promotordeletionsanalysen wurde die MafA-DNA-Bindungsstelle als DLK-responsives Element identifiziert.

4.3.1. Die DLK hemmt die MafA-abhängige Insulinentranskription - in Abhängigkeit von ihrer subzellulären Lokalisation

Zunächst sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und innerhalb welchen Zellkompartimentes die DLK einen inhibitorischen Effekt auf den Transkriptionsfaktor MafA ausübt. In der Literatur finden sich bereits Aussagen über die Lokalisation der DLK innerhalb der Zelle. In Abhängigkeit von untersuchtem Gewebe und Zelllinie wurde die DLK im Nukleus, im Zytoplasma, Plasmamembran- und Golgi-Apparat-assoziiert detektiert (Mata et al. 1996; Douziech et al. 1999; Merritt et al. 1999; Hebert et al. 2000). Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen die DLK in primären pankreatischen Inseln im Nukleus sowie im Zytoplasma. Das genaue Verteilungsmuster der DLK in der Zelle wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie näher untersucht. In HIT-Zellen befindet sich der größte Anteil an DLK, sowohl endogene als auch überexprimierte, im Zytoplasma (Wallbach 2010). Um herauszufinden, ob die Aktivität der DLK von ihrer Lokalisation abhängt, wurden zwei DLK-Mutanten hergestellt: DLK NLS1 und DLK NLS2 (Wallbach 2010). Die DLK besitzt eine zweiteilige Kernerkennungssequenz, welche für den Transport in den Zellkern nötig ist, wobei zur Herstellung der DLK NLS1 die AS 186 und 188 und zur Herstellung der DLK NLS2 die AS 196, 199, 200 in Alanine mutiert wurden. Durch die Mutation in Alanin wird sowohl bei DLK NLS1 als auch bei DLK NLS2 eine Translokation in den Kern fast vollständig verhindert, was bedeutet, dass beide Kernerkennungssequenzen für die Translokation der DLK essentiell sind (Wallbach 2010). Somit stellen die Mutanten der DLK NLS1 und NLS2 eine

geeignete Möglichkeit dar, die Aktivität der DLK in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Vergleich zum Wild-Typ zu charakterisieren.

Auch bezüglich der MafA-Protein-Lokalisation gibt es Hinweise in der Literatur. In Nagetieren hat MafA in den ersten Lebenstagen zwar nur eine geringe Expression, die dafür jedoch fast ausschließlich zytoplasmatisch ist. Nach den ersten Lebenstagen ist MafA dann nur noch nukleär detektierbar (Gustavsen et al. 2008; Aguayo-Mazzucato et al. 2010; Guo J et al. 2010). Der Mechanismus, wie die MafA-Lokalisation postnatal kontrolliert wird, bleibt bislang unerforscht (Aguayo-Mazzucato et al. 2010).

Für die Untersuchungen einer möglichen DLK-induzierten MafA-Hemmung in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation wurden transiente Transfektion in HIT-Zellen durchgeführt. Es wurde das Gal4-System verwendet (s. 3.1.1, S. 79). Es zeigte sich, dass der DLK wt einen deutlich hemmenden Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von MafA hat und dass die Kinase-tote Mutante der DLK keinen hemmenden Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von MafA hat und demnach die Hemmung über die Kinase-Aktivität der DLK geschieht. Nicht nur der DLK wt, sondern auch die Mutanten DLK NLS1 und NLS2 hatten einen hemmenden bzw. verminderten Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von MafA (s. Abb. 3.1). Dies lässt vermuten, dass die Hemmung von DLK auf MafA auch stattfinden kann, wenn eine Kernlokalisierung der DLK nicht möglich ist. Die Hemmung könnte demnach im Zytosol stattfinden. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die NLS-Mutanten der DLK enzymatisch aktiv sind im Sinne einer JNK-Phosphorylierung (Wallbach 2010). Bei dem vorliegenden Experiment bestätigt sich diese enzymatische Aktivität der DLK-NLS-Mutanten.

Bei den Untersuchungen der Wirkung von DLK auf den Promotor des humanen Insulins (s. Abb. 3.2, S. 82) zeigte sich, dass der DLK wt, nicht jedoch die Kinase-tote Mutante der DLK zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität des Promotors des humanen Insulins führt. Auch konnte gezeigt werden, dass die Kernerkenntnissequenzmutanten DLK NLS1 und NLS2 einen inhibitorischen Effekt ausüben, was darauf schließen lässt, dass die Hemmung nicht im Kern, und sondern vermutlich im Zytosol stattfindet.

Die leicht unterschiedlichen hemmenden Effekte von DLK NLS1 und NLS2 lassen sich

möglicherweise mithilfe der mutierten Aminosäuren erklären. NLS1 besitzt Punktmutationen an AS 186 und 188, NLS2 an AS 196, 199 und 200. Die Punktmutation an AS 186 liegt somit direkt neben der Aminosäure, die entscheidend ist für die enzymatischen Aktivität der DLK (AS 185). Eine Interaktion zwischen beiden Aminosäuren könnte dazu führen, dass der inhibitorische Effekt von DLK NLS1 geringer ausfällt als von DLK NLS2.

4.3.2. Die DLK hemmt die MafA-abhängige Insulingentranskription in Abhängigkeit der MafA-Phosphorylierung

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird häufig über Phosphorylierung reguliert. Dabei führt vermehrte Phosphorylierung durch Kinasen entweder zu vermehrter oder verminderter Aktivität der Transkriptionsfaktoren (Wirth 2009). In der Literatur gibt es bereits einige Aussagen bezüglich der Phosphorylierung von MafA. So besitzt MafA in der Transaktivierungsdomäne mehrere Aminosäuren, welche durch Kinasen phosphoryliert werden können (Benkhelifa et al. 2001; Sii-Felice et al. 2005; Han et al. 2007; Rocques et al. 2007; Guo S et al. 2009; Kondo et al. 2009). Unter anderem werden die Aminosäuren S49, T53, T57, S61 und S65 phosphoryliert. Phosphorylierung und Aktivierung dieser Aminosäuren führt zu vermehrter Ubiquitinylierung und proteasomaler Degradation von MafA (Han et al. 2007). Dabei werden die Serin- und Threonin-Aminosäuren sequenziell und kaskadenartig vom C- zum N-Terminus phosphoryliert (Rocques et al. 2007), wobei die Aminosäure S65 als Initiationssignal für die Ubiquitinylierung essentiell ist. Die Kinase, welche S65 phosphoryliert, ist aber bisher unbekannt (Han et al. 2007; Rocques et al. 2007; Guo S et al. 2009; Kanai et al. 2011).

Es wurde untersucht, welche Wirkung die DLK auf die verschiedenen MafA-Mutanten hat und welche Wirkung die DLK auf die MafA-Mutanten-abhängige Insulingentranskription hat.

Betrachtet man die Daten aus Nicht- β -Zellen, in denen die Wirkung der DLK auf die MafA-Mutanten-abhängige Insulingentranskription untersucht wurde (s. Abb. 3.6, S. 90), so ist zu erkennen, dass die basale transkriptionelle Aktivität bei allen MafA-phosphorylierungsdefizienten Punktmutanten höher war als beim MafA Wild-Typ, und zwar: Je weiter C-terminal

des Proteins die mutierte Aminosäure lag, desto höher war die transkriptionelle Aktivität. Han et al. zeigten 2007, dass GSK3 MafA phosphoryliert und degradiert. Sie zeigten, dass GSK3 an jeder Phosphorylierungsstelle wirken konnte, außer an S65. Hat die Phosphorylierung an einer Aminosäure stattgefunden, so wurde jede vierte weiter C-terminal gelegene Stelle sequentiell phosphoryliert (Han et al. 2007). Das Ergebnis aus Abb. 3.6 lässt also vermuten, dass je weniger MafA phosphoryliert und damit degradiert werden kann, desto stärker kann es die Insulinentranskription aktivieren.

Wie in Abb. 3.5 (s. S. 88) ersichtlich, ließ sich feststellen, dass MafA eine um das Dreieinhalbfache gesteigerte transkriptionelle Aktivität aufwies, wenn zusätzlich zu den vier Aminosäuren auch Serin-65 mutiert war. Dies unterstreicht die Bedeutung von Serin-65 für die Funktion von MafA.

In der β -Zelllinie HIT führte die DLK unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus der untersuchten Aminosäuren (AS 49, 53, 57, 61 und 65) innerhalb der Transaktivierungsdomäne von MafA weiterhin zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität von MafA um annähernd die Hälfte des Ausgangswertes (s. Abb. 3.5). In der Nicht- β -Zelllinie jedoch konnten alle MafA-Punktmutanten im Gegensatz zum MafA Wild-Typ nicht durch die DLK gehemmt werden (s. Abb. 3.6). Dies widerspricht einerseits den Ergebnissen aus Abb. 3.5, andererseits wird damit aber die Bedeutung der fünf untersuchten Aminosäuren unterstrichen. Die Phosphorylierungsstellen sind wichtig für die Aktivität der MafA und die Hemmung von MafA durch die DLK. Auch die Mutation der Phosphorylierungsstelle an Serin-65 führte dazu, dass MafA resistent gegenüber der DLK Hemmung war. Dies bedeutet, dass die DLK die bislang unbekannte Kinase sein könnte, welche Serin-65 phosphoryliert. Um dies weiter zu verifizieren, wurden Immunoblotanalysen durchgeführt, welche die Wirkung von der DLK auf die Proteinmenge von MafA S65A untersuchen sollten. Hierbei konnte keine Hemmung festgestellt werden, da vermutlich der pCDNA3-Promotor zu schwach für eine ausreichende Proteinexpression war (Daten nicht gezeigt).

Bei beiden Untersuchungen wurden unterschiedliche Systeme verwendet: Bei den Untersuchungen zu der Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität der MafA-Mutanten in β -Zellen wurden die MafA-Mutanten über Gal-4 an den G5E1B-Promotor

rekrutiert, in den Untersuchungen zu der Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität des humanen Insulingenpromotors in Nicht- β -Zellen wurden die MafA-Mutanten direkt an den humanen Insulingenpromotor rekrutiert. Möglicherweise könnte die Rekrutierung von MafA über das Gal4-System zu einer Konformitätsänderung des Promotors führen. Außerdem könnten auch weitere β -zellspezifische Faktoren eine Rolle spielen, welche in der Nicht- β -Zelllinie nicht berücksichtigt sind. Weitere Gründe für die Diskrepanz zwischen den beiden Untersuchungen hinsichtlich der phosphorylierungsspezifischen MafA-Mutanten sind nicht bekannt.

4.3.3. Die DLK vermindert die Proteinmenge von MafA unter Beteiligung von JNK

Da die Transfektionsstudien auf eine Hemmung der DLK auf MafA im Zytosol hinwiesen, aber MafA nach bisherigem Kenntnisstand fast nur im Nukleus detektiert wurde (Gustavsen et al. 2008; Aguayo-Mazzucato et al. 2010; Guo J et al. 2010), sollte der Frage nachgegangen werden, ob MafA ein direktes Substrat der DLK ist, oder ob möglicherweise eine der DLK untergeordneten Kinase vom Zytosol in den Kern transloziert und zur Phosphorylierung und Hemmung von MafA führt.

Die DLK kann die stressaktivierte Protein-Kinase JNK aktivieren, welche an unterschiedlichen DLK-induzierten Prozessen beteiligt ist (Gallo und Johnson 2002). Um zu untersuchen, ob JNK an der DLK-induzierten Hemmung von MafA beteiligt ist, wurde der JNK-Inhibitor SP600125 verwendet. Dieser führt zu einer verminderten Phosphorylierung und damit zu verminderter Aktivierung von JNK (Bennett et al. 2001). Einige andere Autoren berichten von einer zu schwachen Hemmung der verschiedenen JNK-Isoformen durch den Inhibitor und von einer geringen JNK-Spezifität. So sollen beispielsweise andere Kinasen stärker gehemmt werden als JNK selbst (Bain et al. 2003). Es finden sich aber auch zahlreiche Arbeitsgruppen, die von einer ausreichenden Spezifität berichten. Die Wirkung von SP600125 hinsichtlich einer JNK-Inhibition war in den hier vorliegenden Versuchen ausreichend. Der JNK-Inhibitor wurde verwendet, um die JNK-Aktivität zu senken. In unserer Arbeitsgruppe konnte mithilfe eines *in-vitro*-Kinase-Assays gezeigt werden, dass die TNF α -induzierte Zunahme der enzymati-

schen Aktivität der endogenen DLK unter Einsatz des JNK-Inhibitors ausblieb, was die enge funktionelle Assoziation zwischen DLK und JNK bestätigt (Klimpel 2010) und vermuten lässt, dass eine Hemmung von JNK zu verminderter DLK-Aktivierung führt. Dies beruht auf der Annahme, dass zwischen JNK und DLK eine positive Feedback-Schleife (*feed forward loop*) im Sinne einer Signalamplifikation besteht (Nihalani et al. 2001; Xu et al. 2005). Die DLK liegt unter basalen Bedingungen als Monomer in seiner unphosphorylierten, katalytisch inaktiven Form an sein Adapterprotein JIP (*JNK-interacting protein*) gebunden vor. JNK führt über eine Phosphorylierung von JIP zu einer verminderten Affinität von JIP und DLK und fördert die Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung der DLK (Nihalani et al. 2001).

Unter Einsatz des JNK-Inhibitors in JEG-Zellen wurde die Menge an endogen phosphoryliertem JNK reduziert, nicht jedoch die Menge an unphosphoryliertem JNK, was durch phosphoryierungsspezifische und -unspezifische JNK-Antikörper im Immunoblot dargestellt werden konnte (s. Abb. 3.10). Dies zeigt, dass der JNK-Inhibitor ausreichend funktioniert. Ebenfalls war bei gleichzeitiger DLK-Transfektion eine um den Faktor 1,5 gesteigerte Phosphorylierung von JNK, bezogen auf die JNK-Gesamtmenge, nachweisbar; allerdings nicht signifikant aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten (s. Abb. 3.10, S. 98). Diese Beobachtung stimmt mit der Annahme überein, dass die DLK zu vermehrter JNK-Aktivierung bzw. Phosphorylierung führt. Die leicht unterschiedlichen JNK-Mengen innerhalb einer Gruppe (s. Abb. 3.10 A) können möglicherweise durch die Transfektion und die Zellernte erklärt werden, denen die Zellen ausgesetzt sind. Dabei kann viel Protein verloren gehen.

Es sollte untersucht werden, ob die der DLK untergeordnete Kinase JNK an der DLK-induzierten Verminderung an MafA-Protein beteiligt ist. Bei gleichzeitiger Überexpression von DLK und MafA in JEG-Zellen wurde die MafA-Proteinmenge um ein Drittel reduziert im Vergleich zu alleiniger MafA-Überexpression (s. Abb. 3.8, S. 94 und s. Abb. 3.9, S. 96). Bei Überexpression der Kinase-toten Mutante der DLK war keine Hemmung nachweisbar. Es ließ sich ebenfalls feststellen, dass die DLK-induzierte Verminderung an MafA-Protein nicht mehr vorhanden war, sobald der JNK-Inhibitor eingesetzt wurde (s. Abb. 3.9). Ein naheliegender denkbarer Mechanismus wäre demnach, dass die MAPKKK DLK über eine Aktivierung der ihr untergeordneten MAPK JNK zu einer Hemmung des für die Insulinentranskription wichtigen

Transkriptionsfaktors MafA führt und MafA kein direktes Substrat der DLK darstellt. Durch den Mechanismus des *feed forward loop* zwischen DLK und JNK ist es auch möglich, dass der JNK-Inhibitor über eine Verminderung der JNK-Aktivität auch zu einer Verminderung der DLK-Aktivität führt. Dies könnte die Aufhebung der DLK-induzierten Verminderung der MafA-Proteinmenge erklären und würde bedeuten, dass MafA möglicherweise doch ein direktes Substrat der DLK darstellen kann.

Auch andere Arbeitsgruppen haben Hinweise für eine Beteiligung von JNK an der Insulinentranskription und damit der Bedeutung von JNK für die Pathogenese des Diabetes mellitus geliefert. So konnten Kaneto et al. (2002) zeigen, dass in primären Inseln, die mit einem Ad-JNK-Virus infiziert wurden, die mRNA-Transkripte von Insulin sowie die Insulinsekretion vermindert waren. Vanderford et al. (2008) postulierten, dass die MafA-Expression durch Proteinkinasen bzw. Phosphorylierung reguliert wird. So beschrieben sie, dass in einer β -Zelllinie die MafA-Protein-Expression vermehrt war, wenn diese mit dem allgemeinen Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin behandelt wurden. Außerdem konnten sie zeigen, dass eine Inhibition von JNK durch SP600125 die MafA-Expression induziert und unter niedrigen Glucosekonzentrationen die JNK-Inhibition auch die Insulinexpression steigert (Vanderford et al. 2008).

4.3.4. Die DLK- und MafA-Proteinstabilität werden über die proteasomale Degradation reguliert

Für das Überleben der Zelle ist es nicht nur wichtig, die Proteine entsprechend den Anforderungen zu synthetisieren, sondern auch überschüssige, nicht mehr benötigte, beschädigte oder fehlgefaltete Proteine zu entsorgen (Lübben 2009). Oft wird dies in den Lysosomen bewerkstelligt. Die Lysosomen enthalten Proteasen, welche die Peptidbindungen des zu entsorgenden Proteins hydrolisieren. Neben den Lysosomen ist auch das Proteasom für die Beseitigung der Proteine zuständig. Das Proteasom ist ca. 2000 kDa groß und hat einen Sedimentationskoeffizienten von 26S. In der äußeren Struktur besteht das Proteasom aus einem zylinderförmigen Degradationskomplex, der Ein- und Ausgangsstrukturen und einen

20S-Kern beinhaltet, in dem Proteasen die Proteine bis zu Oligopeptiden und Aminosäuren zerlegen. An den Außenseiten des Proteasoms befinden sich zwei 19S-Module, die für die spezifische Erkennung des Proteins sorgen. Bei der Degradation wird zunächst das abzubauenende Protein im Rahmen einer Kaskade mithilfe dreier Enzyme, wobei die Schlüsselenzyme die E3-Ubiquitin-Ligasen sind, mit dem Abbausignalmolekül Ubiquitin markiert. Wiederholtes Durchlaufen dieser Enzymkaskade führt dazu, dass mehrere Ubiquitine hintereinander gereiht werden (Polyubiquitinylierung) (Lübben 2009). Das durch Polyubiquitinylierung gekennzeichnete Protein kann vom 26S-Proteasomkomplex erkannt, aufgenommen und zerlegt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Proteine MafA und DLK proteasomaler Degradation unterliegen. Dazu wurde mit den strukturell unterschiedlichen Proteasominhibitoren Lactacystin und Epoxomicin gearbeitet. Lactacystin hemmt das Proteasom, indem es an katalytische Untereinheiten der 20S-Komponente bindet und drei Peptidaseaktivitäten (*trypsin-like*, *chymotrypsin-like* und *peptidylglytanyl-peptide*) hemmt, zwei davon irreversibel (Fenteany et al. 1995). Die lysosomalen Proteasen der Zelle hemmt Lactacystin nicht und ist daher ein spezifischer Hemmstoff für die proteasomale Protein-degradation (Craiu et al. 1997). Epoxomicin bindet auch an die katalytischen Untereinheiten des Proteasoms, hemmt damit die drei Peptidaseaktivitäten und ist ebenso ein spezifischer Hemmstoff für den proteasomalen Proteinabbau (Meng et al. 1999).

Es wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Proteine MafA und DLK in ihrer Stabilität durch proteasomalen Abbau beeinflusst werden. In der Literatur finden sich bereits mehrere Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation der DLK über Ubiquitinylierung und proteasomale Degradation. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die DLK-Protein-stabilität durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Hsp70 (*heat shock protein 70*) und CHIP (*c-term Hsp70 interacting protein*) vermindert wird, welche Ubiquitinreste an die DLK ligieren (Daviau et al. 2006). Nachfolgend kommt es zu einer Degradation der DLK im Proteasom. Auch bei den DLK-Homologen Wallenda und DLK-1 konnte durch die E3-Ubiquitin-Ligasen RPM-1, Hiw und Phr1 ein ähnlicher Mechanismus der DLK-Protein-degradation nachgewiesen werden (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Lewcock et al. 2007; Xiong et al. 2010).

Schließlich konnte auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Proteinmenge an endogener DLK in HIT-Zellen durch Lactacystin-Behandlung um 36% gesteigert werden kann (Klimpel 2010).

Auch bei dem MafA-Protein scheinen proteasomale Prozesse an der Degradation beteiligt zu sein (Han et al. 2007; Rocques et al. 2007). Harmon et al. (2005) fanden heraus, dass eine Blockierung des proteasomalen Abbaus mit Lactacystin zu einer Akkumulation von MafA in HIT-Zellen führt. Han et al. (2007) stellten fest, dass eine Behandlung mit MG132, einem weiteren Proteasominhibitor, zu einer Anreicherung an endogenem MafA-Protein in einer β -Zelllinie führt.

Um die proteasomale Degradation von DLK und MafA zu untersuchen, wurden diese in JEG-Zellen überexprimiert, die Zellen mit Lactacystin bzw. Epoxomicin behandelt und mittels Immunoblot analysiert. Wie in Abb. 3.11 (s. S. 100) zu sehen ist, kam es zu keiner signifikanten Änderung der DLK- und MafA-Proteinmenge, wenn die Zellen mit Lactacystin behandelt wurden. Damit stehen die vorliegenden Daten im Widerspruch zu Erkenntnissen, die andere Arbeitsgruppen gewonnen haben. Auch bei gleichzeitiger Überexpression von MafA und DLK und Behandlung mit Lactacystin waren die Proteinmengen unverändert.

Wurden die Zellen jedoch anstelle von Lactacystin mit dem strukturell unterschiedlichen Epoxomicin behandelt, so ließ sich eine deutliche Zunahme sowohl der DLK- als auch der MafA-Proteinmenge beobachten. Die DLK-Bande war um das Neunfache verstärkt, die MafA-Bande um das Achtfache und bei zusätzlicher Überexpression von DLK war die MafA-Bande um das Sechsfache verstärkt. Dies bestätigt die oben erwähnten Befunde in der Literatur, wonach die DLK- und die MafA-Proteindegradation über den proteasomalen Weg reguliert werden könnte. Es konnte jedoch kein Hinweis darauf geliefert werden, ob proteasomale Prozesse an der DLK-induzierten MafA-Hemmung beteiligt sind, da die Hemmung in Anwesenheit der Proteasomeninhibitoren nicht aufgehoben war.

Um herauszufinden, weshalb die Lactacystin-Behandlung weder auf die DLK- noch auf die MafA-Proteinmenge einen Einfluss hatte, wurde die Literatur näher betrachtet. Im Unterschied zu den hier vorliegenden Daten (s. 3.5, S. 99) haben Harmon et al. (2005) und Han et

al. (2007) endogenes MafA nachgewiesen. Ein möglicher Grund für die nicht vorhandene Anreicherung an MafA-Protein trotz Lactacystin-Behandlung kann also darin bestehen, dass hier nur überexprimiertes MafA nachgewiesen werden konnte und dieses einer anderen Regulation unterliegt. Die Arbeitsgruppe um Han et al. (2007) fand außerdem heraus, dass die MafA-Degradation vorwiegend unter niedrigen Glucose-Konzentrationen (0,3 mM) stattfand, während unter hohen Glucose-Konditionen (20 mM) die Degradation unterdrückt wurde, wobei der genaue molekulare Mechanismus unklar blieb. Unter der Einschränkung, dass diese Arbeitsgruppe eine β -Zelllinie verwendete, kann festgestellt werden, dass in dem vorliegenden Experiment die JEG-Zellen ebenfalls hohen Glucosekonzentrationen (25 mM) ausgesetzt waren. Dies mag nach Zusammenschau ein Grund für die nicht nachweisbare Degradationshemmung von MafA durch Lactacystin sein.

In Bezug auf die DLK kann verglichen werden, dass die DLK-Degradation in HIT-Zellen bei kürzerer Behandlungsdauer mit derselben Konzentration an Lactacystin vermindert werden konnte (Klimpel 2010). Aber auch hier wurde endogene und nicht überexprimierte DLK nachgewiesen. Es ist ebenso möglich, dass Menge, Wirkdauer sowie Qualität des Inhibitors suboptimal waren. Andere Gründe für die Diskrepanz sind nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Halbwertszeit der Proteine MafA und DLK in JEG-Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen in unterschiedlichen Zeiträumen mit dem Cycloheximid behandelt und geerntet. Anschließend wurden die Proteine mittels Immunoblot dargestellt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die Translation der Proteinbiosynthese bei Eukaryoten hemmt. Bei der Translation wird in drei Phasen an den Ribosomen die genetische Information der mRNA in die Abfolge von Aminosäuren in Proteinen übersetzt. Bei der Initiationsphase findet das Ribosom den Anfang der zu translatierenden mRNA-Sequenz. Dabei wird die Starter-tRNA an das AUG-Startcodon in der P-Stelle gebunden. Nach der Initiation wird in der Elongationsphase die Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle des 80 S-Ribosoms gebunden und reagiert mit der Peptidyl-tRNA an der P-Stelle unter Bildung einer Peptidbindung (Wintermeyer 2009). Die entladene tRNA wird freigesetzt, und das Ribosom wandert ein Basentriplett weiter, die Elongation wiederholt sich zyklisch, bis die mRNA-Sequenz vollständig translatiert wurde. Dann folgt die Termination, bei der das Protein

freigesetzt wird. Cycloheximid verhindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom, den Transfer der Aminosäuren auf die Peptide und die Freisetzung der tRNA vom Ribosom. Insgesamt wird die Initiation stärker gehemmt als die Elongation (Obrig et al. 1971).

Es stellte sich heraus, dass die Halbwertszeit von DLK in HIT-Zellen 2,5 Stunden betrug (s. Abb. 3.7, S. 92). Dies deckt sich mit anderen Erkenntnissen, wonach die DLK eine Halbwertszeit von 2,43 Stunden hat (Klimpel 2010). Die Halbwertszeit von MafA in HIT-Zellen kann auf ca. sechs Stunden angenommen werden. Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte Ähnliches herausfinden, eine Extrapolation der Daten würde auf eine Halbwertszeit von fünf Stunden kommen (Han et al. 2007). Die Untersuchungen zur Halbwertszeit von MafA konnten keine weiteren Erkenntnisse zum Mechanismus der DLK-induzierten MafA-Degradation liefern, es soll jedoch in weiterführenden Experimenten mittels DLK-siRNA (*small interference RNA* gegen DLK) eine Beteiligung von prädiabetischen Signalen an der DLK-induzierten MafA-Degradation untersucht werden. Um einen Einfluss der prädiabetischen Signale auf die MafA-Proteinneusynthese auszuschließen, sollen die Zellen mit Cycloheximid für den Zeitraum, der der MafA-Halbwertszeit entspricht, behandelt werden.

4.3.5. Die DLK hemmt ein weiteres MafA-abhängiges Gen

Einer der wichtigsten Reize für die Insulinsekretion ist der Anstieg der postprandialen Blutglucosekonzentration. Die pankreatischen β -Zellen müssen, um glucoseabhängig Insulin zu synthetisieren und sezernieren, Information über den Blutglucosespiegel bekommen. Dafür wird Glucose über den Transporter GLUT-2 in die Zelle aufgenommen. Der GLUT-2-Transporter hat dabei eine geringe Affinität zur Glucose und reagiert insulinunabhängig. Die aufgenommene Glucose wird anschließend durch die Glucokinase mithilfe von ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und in die Glykolyse eingebracht. Dadurch kommt es nachfolgend zu einem Anstieg der ATP-Konzentration, welche an die zytoplasmatische Nukleotidbindungsstelle der Kir6.2-Kaliumkanäle bindet und deren Leitfähigkeit vermindert. Die darauffolgende Membrandepolarisation führt über eine Öffnung von Calciumkanälen zur

Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, was die Insulinsekretion zur Folge hat (Hersberger et al. 2009; Koepsell 2009).

Die Glucokinase (auch Hexokinase IV als vierte Isoform der Hexokinasen) ist ein Enzym, welches nur in der Leber und in pankreatischen β -Zellen vorkommt und im Vergleich zu den Hexokinasen der anderen Körperzellen eine niedrige Glucose-Affinität besitzt (hoher K_M -Wert) (Hersberger et al. 2009). Sie kann auf schwankende Blutglucosespiegel reagieren und wirkt als Sensor für die Blutglucosekonzentration (German 1993), sodass die β -Zelle entsprechend glucoseabhängig und proportional Insulin sezernieren kann. Mäuse, deren pankreatische Glucokinase homozygot mutiert war, entwickelten kurz nach der Geburt Diabetes und starben innerhalb der ersten Woche, Mäuse mit heterozygot mutierter Glucokinase entwickelten sehr früh wegen einer gestörten glucoseabhängigen Insulinsekretion einen leichten Diabetes (Terauchi et al. 1995). Außerdem gibt es zahlreiche junge Patienten, die aufgrund von Glucokinasegenmutationen schon neonatal einen MODY Typ2 entwickelten (Porter und Barrett 2005). Damit kommt der Glucokinase eine sehr wichtige Funktion in der Glucosehomöostase des Organismus zuteil.

Es existieren Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor MafA am Mechanismus der glucoseabhängigen Insulinbiosynthese beteiligt ist. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in einer β -Zelllinie MafA das mRNA-Level der Glucokinase erhöht (Wang H et al. 2007). Nach adenoviraler Infektion von Mäusen mit Ad-MafA, Ad-Pdx1 und Ad-NeuroD1 konnten auch Keneto et al. (2005c) in der Leber erhöhte mRNA-Level der Insel-Glucokinase nachweisen, welche nach alleiniger Infektion mit Ad-Pdx1 und Ad-NeuroD1 nicht erhöht war. Auch das mRNA-Niveau des an der Glucose-induzierten Insulinsekretion beteiligten Kir6.2-Kaliumkanals war dabei vermehrt. Die Arbeitsgruppe um Aguayo-Mazzucato et al. (2010) infizierte primäre neonatale Ratten-Inselzellen mit einem Ad-MafA-Virus und fanden ebenfalls vermehrte Glucokinasetranskripte. Zhang et al. (2005) konnten zeigen, dass MafA-defiziente Mäuse verminderte Transkripte von GLUT-2 aufwiesen. Es lässt sich also zusammenfassen, dass MafA neben der Insulingentranskription weitere β -zellspezifische Gene reguliert.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die DLK neben dem humanen Insulingen auch ein weiteres MafA-reguliertes β -zellspezifisches Gen hemmt. Dazu wurden HIT-Zellen mit einem Reportergenplasmid des Glucokinasepromotors transient transfiziert und DLK mit seinen Mutanten überexprimiert (s. Abb. 3.3, S. 84). Unter Expression des DLK Wild-Types kam es zu einer deutlichen Hemmung der Glucokinasepromotoraktivität um fast 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Die DLK scheint also auch an der glucoseabhängigen Insulinsekretion beteiligt zu sein, indem sie zu einer Verminderung der Glucokinasepromotoraktivität und damit zu verminderter Glucokinase-Transkription führt. Die Hemmung der DLK auf den Glucokinasepromotor scheint auch über die katalytische Funktion der DLK vorzugehen, da eine Hemmung durch die Kinase-tote Mutante ausblieb. Da DLK NLS1 und NLS2 ebenfalls keine Änderung der Glucokinasepromotoraktivität hervorriefen, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Prozess, im Gegensatz zu der Wirkung der DLK auf MafA, im Nukleus stattfindet. Dabei ist ungeklärt, ob die DLK unabhängig von einer JNK-Aktivierung über eine Hemmung von MafA oder, was aufgrund des sich im Nukleus abspielenden Prozesses ebenfalls möglich ist, über die Hemmung eines anderen Transkriptionsfaktors zu der verminderten Glucokinasepromotoraktivität führt.

4.4. Die DLK-induzierte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Bcl-xL in β -Zellen ist abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation

Neu aufgetretener Diabetes Mellitus nach Transplantation (NODAT, *new-onset diabetes after transplantation*) ist eine häufige und schwerwiegende Nebenwirkung nach Organtransplantationen. Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus führen durch verminderte Insulinsekretion, erhöhte Insulinresistenz und einen direkten β -zell-toxischen Effekt zu einem NODAT (Jindal et al. 1997). Befunde unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Cyclosporin A in HIT-Zellen und primären Inselzellen zu einer vermehrten Apoptoserate führt, typischerweise ist dies in DNA-Fragmentierung, Caspase-3-Aktivierung (Hengartner 2000) und Reduzierung des Bcl-xL-Gehaltes (Plaumann et al. 2008) sichtbar. Die DLK wird durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus aktiviert und hat über eine

Steigerung der Caspase-3-positiven β -Zellen und damit verbundenen Apoptose eine wichtige Funktion im Entstehen des NODAT (Plaumann et al. 2008).

Neben peripherer Insulinresistenz und einer verminderten β -Zellfunktion im Sinne einer verminderten Insulinbiosynthese spielt auch ein Verlust der β -Zellmasse in der Pathogenese des Diabetes mellitus eine Rolle (Maedler und Donath 2004). Die β -Zellmasse wird unter anderem durch Proliferation und Apoptose reguliert (Rhodes 2005). Chronisch erhöhte Glucosespiegel und klinisch apperenter Diabetes mellitus Typ 2 führen zu Apoptose in humanen β -Zellen (Butler et al. 2003b), unter anderem durch Aktivierung des JNK-Signalweges (Maedler et al. 2008).

CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist ein ubiquitinär exprimierter Transkriptionsfaktor und spielt eine entscheidende Rolle im Überleben und in der Funktion der β -Zellmasse. Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen die transkriptionelle Aktivität von CREB (Oetjen et al. 2005). CREB bindet an Erkennungssequenzen im humanen Insulingenpromotor und stimuliert dessen transkriptionelle Aktivität. Die Hemmung der CREB-abhängigen humanen Insulingentranskription durch Cyclosporin A und Tacrolimus in HIT-Zellen und primären Inselzellen führt zu β -Zell-Dysfunktion und spielt damit auch eine Rolle im Pathomechanismus des NODAT (Oetjen et al. 2003a; Oetjen et al. 2003b). β -Zellspezifisch-CREB-dominant-negative Mäuse werden, durch Apoptose induziert, diabetisch (Jhala et al. 2003). Dominant-negative CREB-Formen aktivieren Caspase-9 und führen zu vermehrter Zytokin-vermittelter β -Zell-Apoptose (Jambal et al. 2003). Die DLK führt zu einer Hemmung des β -zellprotektiven Transkriptionsfaktors CREB (Oetjen et al. 2006).

Es ist bekannt, dass Zytokine in β -Zellen zu Apoptose führen (Donath et al. 2003; Grunnet et al. 2009). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das proinflammatorische Zytokin TNF α über eine Aktivierung der DLK zu einer β -Zell-Apoptose führt (unveröffentlicht). Die Wirkung von TNF α auf die DLK ist dabei von der zellulären Lokalisation der DLK abhängig. TNF α führt zu einer vermehrten Translokation von DLK in den Kern. Demnach findet ein Teil des apoptose-induzierenden Effektes der DLK im Kern statt (Wallbach 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die DLK auf die transkriptionelle Aktivität von Bcl-xL in der β -Zelllinie HIT hat. Bcl-xL ist ein anti-apoptotisches Protein, welches zur Familie der Bcl-2-Proteine gehört und im intrinsischen Weg der Apoptose eine Rolle spielt. Bcl-xL-Überexpression schützt in Neuronen von neonatalen Mäusen vor Apoptose (Parsadanian et al. 1998) Der β -Zell-protective Transkriptionsfaktor CREB führt zu vermehrter Expression von Bcl-xL (Hsieh et al. 2005). Es konnte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der DLK wt, nicht jedoch die Kinase-tote Mutante der DLK einen hemmenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des Bcl-xL-Promotors hat (s. Abb. 3.4, S. 86). Der inhibitorische Effekt der DLK ist dabei wiederum abhängig von ihrer Lokalisation: Eine mutierte Kernerkennungssequenz und damit ein Verhindern des Kerntransportes der DLK hat keinen hemmenden Effekt auf den Bcl-xL-Promotor.

Neben der durch TNF α und Cyclosporin A aktivierten Apoptose führt die DLK also auch über Hemmung des antiapoptotischen Bcl-xL zu einer gesteigerten Apoptoserate der β -Zellen. Dabei sind beide Effekte abhängig von der subzellulären Lokalisation. Ein möglicher Ansatz einer Verminderung des apoptose-induzierenden Effektes der DLK wäre somit eine Hemmung der Translokation der DLK in den Kern, beispielsweise über eine Maskierung der Kernerkennungssequenz mit einem *small molecule*.

4.5. Schlussfolgerung

Sowohl die transkriptionelle Aktivität als auch die Proteinstabilität von MafA wird durch die DLK vermindert. Dabei wird die Proteindegradation von MafA über die der DLK untergeordneten Kinase JNK vermittelt. Die Hemmung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität von MafA findet offenbar im Zytosol statt, da auch die Mutanten der DLK, die nicht in den Kern translozieren können, MafA hemmen. MafA als Transkriptionsfaktor ist hauptsächlich im Nukleus detektierbar (Gustavsen et al. 2008; Aguayo-Mazzucato et al. 2010; Guo J et al. 2010). Ein möglicher Mechanismus wäre demnach, dass die DLK im Zytosol JNK phosphoryliert und aktiviert und das aktivierte JNK in den Nukleus transloziert. Dort phosphoryliert JNK den Transkriptionsfaktor MafA, der dadurch inaktiviert wird bzw. einer vermehrten Degradation im Zytosol unterliegt. Bisher gibt es jedoch nicht viele Erkenntnisse

über eine Translokation von JNK vom Zytosol in den Zellkern. Es scheint eine Stress-induzierte Umverteilung von JNK in Richtung Nukleus zu geben (Wang J et al. 2011), die genauen Mechanismen bedürfen jedoch weiterer Aufklärung.

Die insuffiziente Menge an insulinproduzierenden β -Zellen ist sowohl beim bei Diabetes mellitus Typ 1 und als auch beim Typ 2 ein Hauptfaktor, der zur dysregulierten Blutglucosekonzentration beiträgt. Ein therapeutischer Ansatz wäre folglich, die Zahl der insulinproduzierenden β -Zellen zu erhöhen. Es gibt bereits verschiedene Ansätze, beispielsweise Insel-Transplantation oder die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in β -Zellen, allerdings ist nach aktuellem Forschungsstand noch keine therapeutische Applikation in Aussicht (Porat und Dor 2007). Die Transdifferenzierung von Nicht- β -Zellen (z.B. Hepatozyten) in β -Zellen wäre ein weiterer Ansatz. So zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass man den für die Insulingentranskription essentiellen Transkriptionsfaktor MafA in Nicht- β -Zellen einschleusen kann, um dort die Insulinproduktion zu induzieren (Lu et al. 2011).

Es lässt sich feststellen, dass die Protektion von MafA ein Ansatz zur weiteren Erforschung des Verständnisses der Pathogenese und der Therpiemöglichkeiten des Diabetes mellitus ist. Dabei kommt der Kinase DLK eine Schlüsselrolle in der Pathogenese zu, da sie in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation nicht nur den apoptotischen Zelltod der β -Zellen induziert (Plaumann 2007; Wallbach 2010), sondern auch über eine Hemmung der MafA-abhängigen Insulingentranskription und Glucokinasetranskription zu einem Verlust der β -Zellfunktion beiträgt.

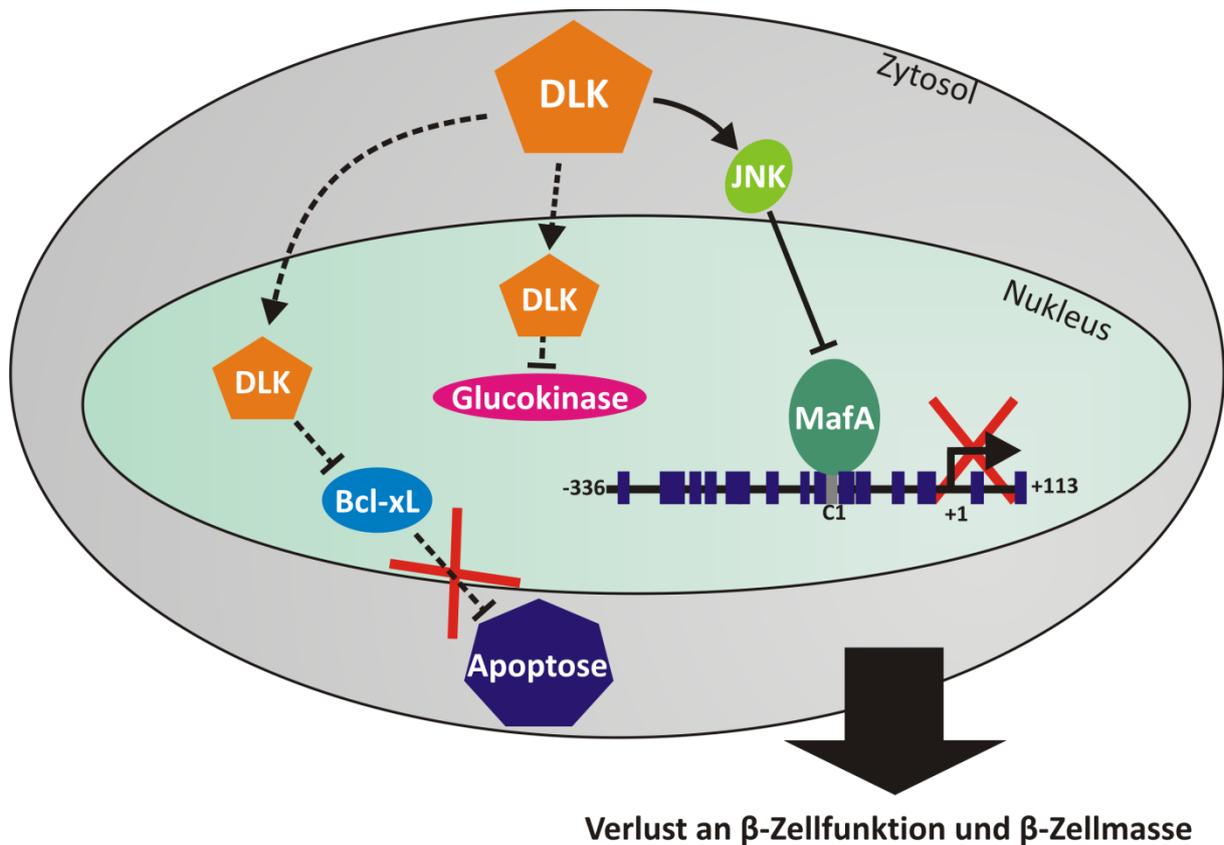


Abb. 4.1: Zusammenfassende Darstellung, wie die DLK in den Verlust der funktionellen β-Zellmasse involviert ist.

Unter basalen Bedingungen ist die DLK im Zytosol lokalisiert. Dort hemmt sie über eine Aktivierung der MAPK JNK den für das Insulingen essentiellen Transkriptionsfaktor MafA, sodass die Insulingentranskription gehemmt wird. Innerhalb des Nucleus hemmt die DLK das antiapoptotische Protein Bcl-xL und trägt somit zur Apoptose und zum Verlust an β-Zellmasse bei. Ebenfalls im Nucleus hemmt die DLK die Glucokinase, welche als Glucosesensor der β-Zelle fungiert. Zusammenfassend tragen alle Mechanismen dazu bei, dass die DLK zu einem Verlust an β-Zellfunktion und β-Zellmasse führt.

5. Zusammenfassung

Die Dekompensation der pankreatischen β -Zelle mit einem progredienten Verlust an β -Zellfunktion und β -Zellmasse ist ein wichtiger Faktor beim Fortschreiten des Diabetes mellitus vom prädiabetischen Zustand zum klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 2. Neben der Insulinsekretion ist auch die Transkription des Insulingens eine wichtige β -Zell-spezifische Funktion. Eine unzureichende Insulinbiosynthese trägt zur Pathogenese des Diabetes mellitus bei. MafA ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion. Es lagen Hinweise auf eine Beteiligung der durch proinflammatorische Zytokine aktivierten Kinase DLK an der MafA-abhängigen Insulingentranskription vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer β -Zelllinie der Mechanismus untersucht, mit der die DLK MafA hemmt. Daten aus Reporterassays zeigten, dass über eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von MafA und über eine Hemmung der humanen Insulingentranskription die DLK zum Verlust der Insulinbiosynthese beitrug. Aus Immunoblotanalysen ging hervor, dass die Proteinmenge von MafA durch die DLK vermindert wurde. Mithilfe von Kernerkenntnissequenzmutanten der DLK konnte nachvollzogen werden, dass die hemmende Wirkung der DLK auf die transkriptionelle Aktivität von MafA außerhalb des Zellkerns stattfand, vermutlich indem die DLK die ihr untergeordnete Kinase JNK aktivierte, welche wiederum MafA phosphorylierte und hemmte. Die DLK hemmte die Transkription des als Glucosensensor fungierenden Enzyms Glucokinase, welches für eine adäquate Insulinsekretion vonnöten ist. Mit einer Hemmung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL durch die DLK wurden weitere Hinweise auf eine Beteiligung der DLK an der β -Zell-Apoptose geliefert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DLK sowohl in den Verlust der β -Zellmasse als auch in den Verlust der β -Zellfunktion im Sinne einer verminderten Insulingentranskription und -sekretion involviert ist. Damit nimmt sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Diabetes mellitus ein. Eine Hemmung der Funktion der DLK könnte ein therapeutischer Ansatz sein, um eine weitere Progression des Diabetes mellitus zu verhindern.

6. Anhang: Vorträge und Poster zum Dissertationsthema

- I. **51. Jahrestagung der ‚Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie‘ (DGPT), Mainz 23. - 25. März 2010**
Hemmung des beta-zellspezifischen Transkriptionsfaktors MafA durch die Dual Leucine Zipper Kinase
Marie-Jeannette **Oehmen**, Corinna Dickel, Roland Blume, Elke Oetjen

- II. **45. Jahrestagung ‚Deutsche Diabetes-Gesellschaft‘, Stuttgart 12. - 15. Mai 2010**
Hemmung des beta-zellspezifischen Transkriptionsfaktors MafA durch die Dual Leucine Zipper Kinase
Marie-Jeannette **Oehmen**, Corinna Dickel, Roland Blume, Elke Oetjen

- III. **10. Inselworkshop, Freiburg 17. - 19. März 2011**
Inhibition of the beta-cell specific transcription factor MafA by the dual leucine zipper kinase (DLK)
Marie-Jeannette **Stahnke**¹, Corinna Dickel¹, Roland Blume¹, Elke Oetjen^{1,2}
¹ Abteilung Pharmakologie, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen.
² Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martini-str. 52, 20246 Hamburg.

7. Literaturverzeichnis

- Abrams B, Grill B, Huang X und Jin Y (2008): Cellular and molecular determinants targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR protein RPM-1 to perisynaptic regions. *Dev Dyn* 237: 630-639
- ADA (2009): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1: S62-67
- Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, Li WC, Toschi E, Jermendy A, Juhl K, Mao K, Weir GC, Sharma A, et al. (2010): Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia* 54: 583-593
- Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL und Ozcan S (2008): Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 415: 1-10
- Aramata S, Han SI, Yasuda K und Kataoka K (2005): Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim Biophys Acta* 1730: 41-46
- Aramata S, Han SI und Kataoka K (2007): Roles and regulation of transcription factor MafA in islet beta-cells. *Endocr J* 54: 659-666
- Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, Sosa-Pineda B und Stein R (2006): MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* 55: 297-304
- Artner I, Hang Y, Guo M, Gu G und Stein R (2008): MafA is a dedicated activator of the insulin gene in vivo. *J Endocrinol* 198: 271-279
- Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, Magnuson M und Stein R (2010): MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes* 59: 2530-2539
- Ashcroft SJ, Hammonds P und Harrison DE (1986): Insulin secretory responses of a clonal cell line of simian virus 40-transformed B cells. *Diabetologia* 29: 727-733
- Aspinwall CA, Lakey JR und Kennedy RT (1999): Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274: 6360-6365
- Bain J, McLaughlan H, Elliott M und Cohen P (2003): The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371: 199-204
- Benkhelifa S, Provot S, Lecoq O, Pouponnot C, Calothy G und Felder-Schmittbuhl MP (1998): mafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells. *Oncogene* 17: 247-254
- Benkhelifa S, Provot S, Nabais E, Eychene A, Calothy G und Felder-Schmittbuhl MP (2001): Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* 21: 4441-4452

- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, et al. (2001): SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13681-13686
- Bergeron P, Douziech M, Daigle N und Blouin R (1997): Inhibition of cell growth by overexpression of the ZPK gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 153-155
- Bergstrom RW, Wahl PW, Leonetti DL und Fujimoto WY (1990): Association of fasting glucose levels with a delayed secretion of insulin after oral glucose in subjects with glucose intolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1447-1453
- Blouin R, Beaudoin J, Bergeron P, Nadeau A und Grondin G (1996): Cell-specific expression of the ZPK gene in adult mouse tissues. *DNA Cell Biol* 15: 631-642
- Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA und Vijayan M (1971): Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature* 231: 506-511
- 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: 248-254
- Butler AE, Janson J, Soeller WC und Butler PC (2003a): Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52: 2304-2314
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA und Butler PC (2003b): Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110
- Butler AE, Robertson RP, Hernandez R, Matveyenko AV, Gurlo T und Butler PC (2012): Beta cell nuclear musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A (MafA) is deficient in type 2 diabetes. *Diabetologia* 55: 2985-2988
- Carrier P, Deschambeault A, Audet C, Talbot M, Gauvin R, Giasson CJ, Auger FA, Guerin SL und Germain L (2009): Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 2645-2652
- CDC (1998): centers for disease control and prevention: Diabetes during pregnancy-United States, 1993-1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 47: 408-414
- Cha JY, Kim HI, Im SS, Li TZ und Ahn YH (2001): HNF1 and/or HNF3 may contribute to the tissue specific expression of glucokinase gene. *Exp Mol Med* 33: 59-63
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805
- Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, Lu Y, Zhao F, Wang L und Zhou Q (2009): BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *J Biol Chem* 284: 10004-10012

- Chen X, Rzhetskaya M, Kareva T, Bland R, During MJ, Tank AW, Kholodilov N und 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
- Collins CA, Waikar YP, Johnson SL und DiAntonio A (2006): Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* 51: 57-69
- Colter JS, Brown RA und Ellem KA (1962): Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 55: 31-39
- Couture JP, Daviau A, Fradette J und Blouin R (2009): The mixed-lineage kinase DLK is a key regulator of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *PLoS One* 4: e4743
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL und Rock KL (1997): Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 272: 13437-13445
- Daviau A, Proulx R, Robitaille K, Di Fruscio M, Tanguay RM, Landry J, Patterson C, Durocher Y und 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
- Daviau A, Di Fruscio M und Blouin R (2009): The mixed-lineage kinase DLK undergoes Src-dependent tyrosine phosphorylation and activation in cells exposed to vanadate or platelet-derived growth factor (PDGF). *Cell Signal* 21: 577-587
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR und Subramani S (1987): Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737
- Donath MY und Halban PA (2004): Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47: 581-589
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E und Kaiser N (1999): Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48: 738-744
- Donath MY, Storling J, Maedler K und Mandrup-Poulsen T (2003): Inflammatory mediators and islet beta-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 und Reinecke M (2005): Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2: S108-113
- Dorow DS, Devereux L, Dietzsch E und De Kretser T (1993): Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur J Biochem* 213: 701-710

- Douziech M, Laberge G, Grondin G, Daigle N und 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
- Efrat S, Tal M und Lodish HF (1994): The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci* 19: 535-538
- Eto K, Kawauchi T, Osawa M, Tabata H und Nakajima K (2009): Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. *Neurosci Res* 66: 37-45
- Fan G, Merritt SE, Kortjenann M, Shaw PE und Holzman LB (1996): Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* 271: 24788-24793
- Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, et al. (2001): High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50: 1290-1301
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ und Schreiber SL (1995): Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268: 726-731
- Friedrich K und Behrmann I: Zelluläre Signalprozesse; in: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. hrsg. von Scharl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 631-670
- Gallo KA und Johnson GL (2002): Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 663-672
- Garrington TP und Johnson GL (1999): Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-218
- Germain L, Fradette J, Robitaille H, Guignard R, Grondin G, Nadeau A und 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
- German MS (1993): Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1781-1785
- Giannini C, Mohn A und Chiarelli F (2009): Technology and the issue of cost/benefit in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 25 Suppl 1: S34-44
- Grunnet LG, Aikin R, Tonnesen MF, Paraskevas S, Blaabjerg L, Storling J, Rosenberg L, Billestrup N, Maysinger D und Mandrup-Poulsen T (2009): Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes* 58: 1807-1815
- Guo J, Zhu JX, Deng XH, Hu XH, Zhao J, Sun YJ und Han X (2010): Palmitate-induced inhibition of insulin gene expression in rat islet beta-cells involves the ceramide transport protein. *Cell Physiol Biochem* 26: 717-728

- Guo S, Burnette R, Zhao L, Vanderford NL, Poitout V, Hagman DK, Henderson E, Ozcan S, Wadzinski BE und Stein R (2009): The stability and transactivation potential of the mammalian MafA transcription factor are regulated by serine 65 phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 759-765
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B und Davis RJ (1996): Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15: 2760-2770
- Gustavsén CR, Chevret P, Krasnov B, Mowlavi G, Madsen OD und Heller RS (2008): The morphology of islets of Langerhans is only mildly affected by the lack of Pdx-1 in the pancreas of adult *Meriones* jirds. *Gen Comp Endocrinol* 159: 241-249
- Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM und Bastiani M (2009): Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* 323: 802-806
- Han SI, Aramata S, Yasuda K und Kataoka K (2007): MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 27: 6593-6605
- Harmon JS, Stein R und Robertson RP (2005): Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280: 11107-11113
- Harper ME, Ullrich A und Saunders GF (1981): Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4458-4460
- Hay CW und Docherty K (2006): Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes* 55: 3201-3213
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW und Vogelstein B (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2509-2514
- Hebert SS, Daviau A, Grondin G, Latreille M, Aubin RA und Blouin R (2000): The mixed lineage kinase DLK is oligomerized by tissue transglutaminase during apoptosis. *J Biol Chem* 275: 32482-32490
- Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776
- Henquin JC (2000): Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760
- Hersberger M, v.Eckardstein S und v.Eckardstein A: Hormone; in: *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. hrsg. von Scharl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 687-748
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A und Karin M (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-2148

- Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G und Ohno S (1996): Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12: 641-650
- Hirai S, Katoh M, Terada M, Kyriakis JM, Zon LI, Rana A, Avruch J und Ohno S (1997): MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 15167-15173
- Hirai S, Kawaguchi A, Hirasawa R, Baba M, Ohnishi T und 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 und Ohno S (2005): Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. *Gene Expr Patterns* 5: 517-523
- Hirai S, Cui de F, Miyata T, Ogawa M, Kiyonari H, Suda Y, Aizawa S, Banba Y und 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
- Holzman LB, Merritt SE und 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* 269: 30808-30817
- Horiuchi D, Collins CA, Bhat P, Barkus RV, Diantonio A und Saxton WM (2007): Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr Biol* 17: 1313-1317
- Hsieh YC, Chen YH, Jao HC, Hsu HK, Huang LJ und Hsu C (2005): Role of cAMP-response element-binding protein phosphorylation in hepatic apoptosis under protein kinase C alpha suppression during sepsis. *Shock* 24: 357-363
- IDF: Diabetes Atlas 2012. hrsg. von InternationalDiabetesFederation; 5. Auflage; 2012, 1-9, <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes>, Abrufdatum: 02.12.2012
- Jambal P, Masterson S, Nesterova A, Bouchard R, Bergman B, Hutton JC, Boxer LM, Reusch JE und 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
- Jhala US, Canettieri G, Screatton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M und Montminy M (2003): cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17: 1575-1580
- Jindal RM, Sidner RA und Milgrom ML (1997): Post-transplant diabetes mellitus. The role of immunosuppression. *Drug Saf* 16: 242-257
- Johnson AB und Taylor R (1990): Diabetes mellitus. *Postgrad Med J* 66: 1010-1024
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T und Edlund H (1994): Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609

- 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, Zraika S, Utzschneider KM und Hull RL (2009): The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia* 52: 1003-1012
- Kanai K, Aramata S, Katakami S, Yasuda K und Kataoka K (2011): Proteasome activator PA28gamma stimulates degradation of GSK3-phosphorylated insulin transcription activator MAFA. *J Mol Endocrinol* 47: 119-127
- Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S und Weir GC (2002): Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 277: 30010-30018
- Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Matsuhisa M und Yamasaki Y (2005a): Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 1: 65-72
- Kaneto H, Kawamori D, Matsuoka TA, Kajimoto Y und Yamasaki Y (2005b): Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Ther* 12: 529-533
- Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Hori M und Yamasaki Y (2005c): A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes. *J Biol Chem* 280: 15047-15052
- Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Yamamoto K, Kato K, Shiraiwa T, Katakami N, Yamasaki Y, Matsuhisa M und Matsuoka TA (2008): PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J* 55: 235-252
- Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M und Handa H (2002): MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 277: 49903-49910
- Kataoka K, Shioda S, Ando K, Sakagami K, Handa H und Yasuda K (2004): Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells. *J Mol Endocrinol* 32: 9-20
- Kim KY, Kim BC, Xu Z und Kim SJ (2004): Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *J Biol Chem* 279: 29478-29484
- King H, Aubert RE und Herman WH (1998): Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431
- Klimpel C: Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF alpha und IL-1 beta auf die Aktivität und die Proteinmenge der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase in einer Betazelllinie. Med. Diss. Göttingen 2010

- Koepsell H: Kanäle und Transporter; in: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. hrsg. von Scharl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 597-630
- Kohler PO, Bridson WE, Hammond JM, Weintraub B, Kirschner MA und Van Thiel DH (1971): Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 153: 137-153
- Kondo T, El Khattabi I, Nishimura W, Laybutt DR, Geraldine P, Shah S, King G, Bonner-Weir S, Weir G und Sharma A (2009): p38 MAPK is a major regulator of MafA protein stability under oxidative stress. *Mol Endocrinol* 23: 1281-1290
- Koranyi L, James DE, Kraegen EW und Permutt MA (1992): Feedback inhibition of insulin gene expression by insulin. *J Clin Invest* 89: 432-436
- Krüger M, Schwaninger M, Blume R, Oetjen E und Knepel W (1997): Inhibition of CREB- and cAMP response element-mediated gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 in T cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 433-440
- Kukekov NV, Xu Z und Greene LA (2006): Direct interaction of the molecular scaffolds POSH and JIP is required for apoptotic activation of JNKs. *J Biol Chem* 281: 15517-15524
- Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA und Kahn CR (1999): Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langer O (1993): Management of gestational diabetes. *Clin Perinatol* 20: 603-617
- Lazar MA (2005): How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307: 373-375
- Lewcock JW, Genoud N, Lettieri K und Pfaff SL (2007): The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* 56: 604-620
- Lu J, Luo H, Wu H, Lan MS, Tan J und Lu D (2011): Recombinant MafA protein containing its own protein transduction domain stimulates insulin gene expression in IEC-6 cells. *Life Sci* 89: 72-77
- Lübber M: Proteine; in: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. hrsg. von Scharl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 31-80
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, et al. (2007): A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2: 1236-1247
- MacDonald PE, Joseph JW und Rorsman P (2005): Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 2211-2225
- Maedler K und Donath MY (2004): Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res* 62 Suppl 3: 67-73

- Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N und Donath MY (2001): Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50: 1683-1690
- Maedler K, Schulthess FT, Bielman C, Berney T, Bonny C, Prentki M, Donath MY und Roduit R (2008): Glucose and leptin induce apoptosis in human beta-cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. *FASEB J* 22: 1905-1913
- Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M und Krolewski AS (1999): Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23: 323-328
- Mata M, Merritt SE, Fan G, Yu GG und 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
- Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A und Stein R (2003): Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol* 23: 6049-6062
- Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M und Stein R (2004): The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2930-2933
- Matsuoka TA, Kaneto H, Stein R, Miyatsuka T, Kawamori D, Henderson E, Kojima I, Matsuhisa M, Hori M und Yamasaki Y (2007): MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol Endocrinol* 21: 2764-2774
- Melloul D, Marshak S und Cerasi E (2002): Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45: 309-326
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N und Crews CM (1999): Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10403-10408
- Merritt SE, Mata M, Nihalani D, Zhu C, Hu X und Holzman LB (1999): The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *J Biol Chem* 274: 10195-10202
- Miller BR, Press C, Daniels RW, Sasaki Y, Milbrandt J und DiAntonio A (2009): A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat Neurosci* 12: 387-389
- Nadeau A, Grondin G und Blouin R (1997): In situ hybridization analysis of ZPK gene expression during murine embryogenesis. *J Histochem Cytochem* 45: 107-118
- Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD und 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

- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB und Tsai MJ (1997): Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-2334
- Nihalani D, Merritt S und 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 und 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 und Holzman LB (2003): Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J Biol Chem* 278: 28694-28702
- Nihalani D, Wong H, Verma R und Holzman LB (2007): Src family kinases directly regulate JIP1 module dynamics and activation. *Mol Cell Biol* 27: 2431-2441
- Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, Bonner-Weir S und Sharma A (2006): A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol* 293: 526-539
- Obrig TG, Culp WJ, McKeenan WL und Hardesty B (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* 246: 174-181
- Oetjen E, Baun D, Beimesche S, Krause D, Cierny I, Blume R, Dickel C, Wehner S und Knepel W (2003a): Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Mol Pharmacol* 63: 1289-1295
- Oetjen E, Grapentin D, Blume R, Seeger M, Krause D, Eggers A und 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367: 227-236
- Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P und 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 und 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, Cierny I, Schlag C, Kutschenko A, Kratzner R, Stein R und Knepel W (2007): Inhibition of MafA transcriptional activity and human insulin gene transcription by interleukin-1beta and mitogen-activated protein kinase kinase kinase in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia* 50: 1678-1687
- Ohneda K, Ee H und German M (2000): Regulation of insulin gene transcription. *Semin Cell Dev Biol* 11: 227-233
- Olbrot M, Rud J, Moss LG und Sharma A (2002): Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6737-6742
- Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeldt J, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR und Polonsky KS (2004): Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in betaIRKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E41-49
- Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holtzman DM und Snider WD (1998): Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 18: 1009-1019
- Permutt MA und Kipnis DM (1972): Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J Biol Chem* 247: 1194-1199
- Phu do T, Wallbach M, Depatie C, Fu A, Screatton RA und Oetjen E (2011): Regulation of the CREB coactivator TORC by the dual leucine zipper kinase at different levels. *Cell Signal* 23: 344-353
- Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Standiford D, Khoury PR und Zeitler P (1996): Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr* 128: 608-615
- Plaumann S: Wirkung des Immunsuppressivums Cyclosporin A und der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase auf das Überleben pankreatischer Beta-Zellen. Med. Diss. Göttingen 2007
- Plaumann S, Blume R, Borchers S, Steinfelder HJ, Knepel W und Oetjen E (2008): Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of beta-cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A. *Mol Pharmacol* 73: 652-659
- Poitout V (2008): Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochem Soc Trans* 36: 901-904
- Poitout V und Robertson RP (2002): Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339-342
- Poitout V, Olson LK und Robertson RP (1996): Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest* 97: 1041-1046
- Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA und Van Cauter E (1988): Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318: 1231-1239

- Porat S und Dor Y (2007): New sources of pancreatic beta cells. *Curr Diab Rep* 7: 304-308
- Porter JR und Barrett TG (2005): Monogenic syndromes of abnormal glucose homeostasis: clinical review and relevance to the understanding of the pathology of insulin resistance and beta cell failure. *J Med Genet* 42: 893-902
- Reddy UR und Pleasure D (1994): Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1494-1495
- Rhodes CJ (2005): Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307: 380-384
- Robinson MJ und Cobb MH (1997): Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186
- Robitaille H, Proulx R, Robitaille K, Blouin R und Germain L (2005): The mitogen-activated protein kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 280: 12732-12741
- Rocques N, Abou Zeid N, Sii-Felice K, Lecoin L, Felder-Schmittbuhl MP, Eychene A und Pouponnot C (2007): GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol Cell* 28: 584-597
- Romano G, Pacilio C und Giordano A (1999): Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* 17: 191-202
- Sadowski I und Ptashne M (1989): A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 17: 7539
- Sakuma H, Ikeda A, Oka S, Kozutsumi Y, Zanetta JP und 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
- Samaras SE, Zhao L, Means A, Henderson E, Matsuoka TA und Stein R (2003): The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *J Biol Chem* 278: 12263-12270
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual; 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC und 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: 4339-4343
- Sharma A und Stein R (1994): Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. *Mol Cell Biol* 14: 871-879
- Sharma A, Olson LK, Robertson RP und Stein R (1995): The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9: 1127-1134

-
- Shieh SY und Tsai MJ (1991): Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J Biol Chem* 266: 16708-16714
- Sii-Felice K, Pouponnot C, Gillet S, Lecoin L, Girault JA, Eychene A und Felder-Schmittbuhl MP (2005): MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett* 579: 3547-3554
- Slack JM (1995): Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL und Habener JF (1997): Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-139
- Stumvoll M, Goldstein BJ und van Haeften TW (2005): Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-1346
- Tanaka S und Hanafusa H (1998): Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a ras-independent mechanism. JNK1 activation inhibited by kinase negative forms of MLK3 and DLK mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 273: 1281-1284
- Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, Kasai H, Suzuki H, Ueda O, Kamada N, et al. (1995): Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem* 270: 30253-30256
- Tominaga M (1999): Diagnostic criteria for diabetes mellitus. *Rinsho Byori* 47: 901-908
- Treisman R (1996): Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8: 205-215
- Vanderford NL, Andrali SS und Ozcan S (2007): Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 282: 1577-1584
- Vanderford NL, Cantrell JE, Popa GJ und Ozcan S (2008): Multiple kinases regulate mafA expression in the pancreatic beta cell line MIN6. *Arch Biochem Biophys* 480: 138-142
- Wallbach M: Identifikation einer funktionellen Kerner kennungssequenz in der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase. Med. Diss. Göttingen 2010
- Wang H, Brun T, Kataoka K, Sharma AJ und Wollheim CB (2007): MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50: 348-358
- Wang J, Tang R, Lv M, Wang Q, Zhang X, Guo Y, Chang H, Qiao C, Xiao H, Li X, et al. (2011): Defective anchoring of JNK1 in the cytoplasm by MKK7 in Jurkat cells is associated with resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Biol Cell* 22: 117-127
- Watanabe T, Yanagisawa M, Matsubara N, Obinata M und Matsui Y (1997): Assignment of the murine protein kinase gene DLK to chromosome 15 in the vicinity of the bt/Koa locus by genetic linkage analysis. *Genomics* 40: 375-376
- Weir GC und Bonner-Weir S (2004): Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3: S16-21

-
- Wintermeyer W: Translation; in: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. hrsg. von Schartl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 401-416
- Wirth T: Transkription; in: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. hrsg. von Schartl M, Gessler M und v.Eckardstein A; 1. Auflage; Elsevier Verlag, München 2009, 353-373
- Xiong X, Wang X, Ewanek R, Bhat P, Diantonio A und Collins CA (2010): Protein turnover of the Wallenda/DLK kinase regulates a retrograde response to axonal injury. *J Cell Biol* 191: 211-223
- Xu Z, Maroney AC, Dobrzanski P, Kukekov NV und 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 und Greene LA (2003): POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J* 22: 252-261
- Xu Z, Kukekov NV und 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
- Yan D, Wu Z, Chisholm AD und Jin Y (2009): The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell* 138: 1005-1018
- Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, et al. (2005): MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25: 4969-4976
- Zhao L, Cissell MA, Henderson E, Colbran R und Stein R (2000): The RIPE3b1 activator of the insulin gene is composed of a protein(s) of approximately 43 kDa, whose DNA binding activity is inhibited by protein phosphatase treatment. *J Biol Chem* 275: 10532-10537
- Zhao L, Guo M, Matsuoka TA, Hagman DK, Parazzoli SD, Poitout V und Stein R (2005): The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* 280: 11887-11894
- Zimmet P, Alberti KG und Shaw J (2001): Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787

Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei meiner Betreuerin Prof. Dr. med. Elke Oetjen bedanken, die mich in nie enden wollender Geduld betreute, die mir den Spaß an der Wissenschaft vermittelte, die mir viel zutraute und mit großem Optimismus meine Arbeit gefördert hat.

Herrn Prof. Dr. med. Zimmermann bin ich zu großem Dank verpflichtet, da ich in seiner Abteilung meine Arbeit verrichten durfte und in seinen Data Meetings konstruktive Kritik und Unterstützung bekam.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der Abteilung Pharmakologie möchte ich meinen Dank für die gute Zusammenarbeit, das kollegiale Klima und die Hilfsbereitschaft aussprechen. Insbesondere diejenigen, die mir bei dem Erlernen von Methoden halfen und mir bei Problemen mit Ratschlägen zur Seite standen, möchte ich erwähnen: Roland Blume, Rohollah Babaei, Dr. Phu Do Thanh und Dr. Katrin Wittköpper.

Meinen Eltern und meinem Ehemann Niklas möchte ich für ihre Geduld, die immer währende Unterstützung sowie das Korrekturlesen der Dissertation danken.