

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

**Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β
auf die CREB-abhängige Gentranskription und das Zellüberleben
in Abhängigkeit von der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase in
einer Betazelllinie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Svenja Börchers
aus Bremen

Göttingen 2014

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	V
<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	IX
1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Apoptose	4
1.3 Das cAMP-Responsive-Element (CRE)-bindende Protein CREB	7
1.4 Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes durch Cyclosporin A und die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK)	9
1.5 Wirkung der DLK und der c-Jun-N-terminalen Kinase JNK	10
1.6 Interleukin-1Beta (IL-1β) und Diabetes mellitus	14
1.7 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF-α) und Diabetes mellitus	15
1.8 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Biologische und chemische Materialien	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Medienbestandteile und Seren.....	19
2.1.3 Antibiotika.....	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Molekulargewichtsmarker und Puffer für Restriktionsenzyme.....	19
2.1.6 Antikörper.....	19
2.1.7 Zytokine.....	20
2.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör	20
2.2.1 Verbrauchsmaterialien	20
2.2.2 Geräte und Zubehör	21
2.3 Plasmide und siRNA	22
2.3.1 Reportergen-Plasmide	22
2.3.2 Expressionsvektoren	23
2.3.3 Leervektoren	24
2.3.4 siRNA.....	24
2.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	26
2.4.1 Sterilisation und Standards	27
2.4.2 Nährboden	27
2.4.3 Bakterienstamm	28
2.4.4 Transformation kompetenter E.coli.....	28

2.4.5	Herstellung von Vorkulturen und Langzeitaufbewahrung transformierter Bakterien.....	28
2.4.6	DNA-Großaufbereitung mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.....	29
2.4.7	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	30
2.4.8	Restriktionsenzymverdau.....	31
2.4.9	Horizontale Agarosegelelektrophorese.....	31
2.5	Standardtechniken für das Arbeiten mit Zellkulturen.....	33
2.5.1	Zelllinie HIT-T15.....	33
2.5.2	Puffer und Nährmedien.....	33
2.5.3	Standardbedingungen und Zellkultivierung.....	34
2.5.4	Splitten der HIT-T15-Zellen.....	35
2.5.5	Mediumwechsel.....	35
2.5.6	Langzeitaufbewahrung, Gefrierkonservierung und Revitalisierung von HIT-T15-Zellen	36
2.5.7	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für das jeweilige Experiment.....	36
2.5.7.1	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den MTT-Vitalitätstest.....	37
2.5.7.2	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den Luciferase-Assay.....	37
2.5.7.3	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den siRNA-Luciferase-Assay.....	38
2.5.7.4	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den Immunfluoreszenz-Assay.....	38
2.5.8	Transfektion von Plasmid-DNA bzw. siRNA.....	38
2.5.8.1	Transfektion nach der METAFECTENE TM -Methode.....	39
2.5.8.2	Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode.....	40
2.5.9	Behandlung der HIT-T15-Zellen mit Reagenzien.....	42
2.6	MTT-Vitalitätstest.....	45
2.7	Luciferase-Reportergen-Assay.....	46
2.8	Immunfluoreszenz-Assay.....	49
2.9	Statistik.....	53
3.	Ergebnisse.....	54
3.1	Nachweis endogener DLK in HIT-T15-Zellen.....	54
3.2	Der Effekt von TNF-α und IL-1β auf die CRE- und CREB-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reportergen-Assay.....	55
3.2.1	Beeinflussung der stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription durch TNF- α	56
3.2.2	Beeinflussung der stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription durch TNF- α	57
3.2.3	Vergleich des Effekts von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante auf die Wirkung von TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription.....	59
3.2.4	Die Wirkung von TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von DLK-Mutante oder Bluescript-DNA.....	61
3.2.5	Beeinflussung der stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription durch IL-1 β	62
3.2.6	Die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription.....	65

3.3 Der Effekt von siRNA gegen DLK auf die Wirkung von TNF-α und IL-1β auf die CRE-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reporter-Gen-Assay	67
3.3.1 Die Wirkung der Verminderung endogener DLK durch siRNA auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von TNF- α	68
3.3.2 Die Wirkung der Verminderung endogener DLK durch siRNA auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von IL-1 β	71
3.4 Der Effekt der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β auf das Überleben der Betazelllinie HIT-T15 im MTT-Vitalitätstest.....	73
3.4.1 Die Wirkung von TNF- α auf das Betazellüberleben.....	73
3.4.2 Die Wirkung von IL-1 β auf das Betazellüberleben	75
3.5 Die Wirkung von Cyclosporin A (CsA), TNF-α und IL-1β auf die Apoptoseinduktion der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 in An- und Abwesenheit von überexprimierter DLK, untersucht im Immunfluoreszenz-Assay.....	77
3.5.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von Cyclosporin A auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	79
3.5.2 Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von TNF- α auf das Betazellüberleben.....	80
3.5.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von TNF- α auf die Betazellapoptose in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp	81
3.5.4 Zeitabhängiger Effekt von TNF- α auf die Betazellapoptose in An- und Abwesenheit von DLK	83
3.5.5 Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von IL-1 β auf das Betazellüberleben	85
3.5.6 Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose.....	87
3.5.7 Zeitabhängiger Effekt von IL-1 β in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose.....	89
4. Diskussion.....	91
4.1 HIT-T15-Zellen sind ein geeignetes Modellsystem.....	92
4.2 Hemmung der CRE-/CREB-abhängigen Gentranskription durch TNF-α und IL-1β	94
4.3 Verstärkung der TNF-α-vermittelten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch Überexpression von DLK.....	97
4.4 Beteiligung der DLK an der TNF-α- und IL-1β-vermittelten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription.....	99
4.5 TNF-α- und IL-1β-induzierter Betazelltod	101
4.6 Wirkung der DLK auf die Cyclosporin A-vermittelte Betazellapoptose.....	102
4.7 Wirkung von TNF-α und IL-1β in Abhängigkeit von der DLK auf die Betazellapoptose.....	103

4.7.1 Effekt von einzeln eingesetztem TNF- α , IL-1 β sowie überexprimierter DLK auf die Betazellapoptose.....	103
4.7.2 Die unterschiedliche Vermittlung der TNF- α - und IL-1 β -induzierten Betazellapoptose in Abhängigkeit von der DLK.....	105
4.8 Schlussfolgerung und Ausblick.....	108
5. Zusammenfassung	115
6. Anhang	116
7. Literaturverzeichnis.....	117

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
Amp	Ampicillin
Apaf-1	Apoptotic Protease-Activating-Factor-1
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bcl-2	B-Cell Leukaemia/ Lymphoma-2
BID	BH3-interacting domain-death agonist
bp	Basenpaare
BS	Bluescript
BSA	Rinderserum-Albumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
°C	Grad Celsius
CAD	Caspase-aktivierte DNase
Cam-Kinase	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
CBP	CREB-bindendes-Protein
cDNA	komplementäre DNA
c-Jun	Jun Oncogene
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsives Element bindendes Protein
CRTC	CREB-regulierender transkriptioneller Koaktivator
CsA	Cyclosporin A
C-terminal	Carboxy-terminal
Cyt C	Cytochrom C
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	Death domain = Todesdomäne
DEAE	Diethylaminoethyl
DISC	Death-Inducing-Signaling-Complex
DLK	Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase
DLK K185A	DLK-Mutante, bei der an Position 185 die Aminosäure Lysin durch Alanin ersetzt wurde, hat keine Kinase-Aktivität

Abkürzungsverzeichnis

DM Typ 1	Diabetes mellitus Typ 1
DM Typ 2	Diabetes mellitus Typ 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EC ₅₀	halbmaximale Effektkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
Ethanol abs.	Ethanol absolutus (99%iger Alkohol)
FADD	Fas-assoziiertes-Todesdomänen-Protein
Fas	F7-assoziiertes-Oberflächen-Protein, Funktion eines Todesrezeptors, wird auch CD95 genannt
FasL	Fas-Ligand
fl	full length
FSK	Forskolin
G	Gauge
g	Gramm, auch: Erdbeschleunigung
G(S)P	reich an Glycin, (Serin) und Prolin
GFPTpz	grün fluoreszierendes Protein Topaz Gold
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
h	Stunde
HIT	Hamster-Insulinom-Tumor
hv	emittiertes Licht
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IFN- γ	Interferon-Gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor-1
IL-1 β	Interleukin-1Beta
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRAK-1	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase-1
IRS-1 und 2	Insulin-Rezeptor-Substrat 1 und 2
I κ B	NF- κ B hemmendes Protein
JIP	JNK-interacting-Protein
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
LB	Luria Bertani
LB _{Amp}	LB mit Ampicillin-Zusatz
Luc	Luciferase
LZK	Leucin-Zipper-Bearing Kinase
m	Meter
M	Molar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MAPK(inase)	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min.	Minute
MKK	als Synonym des Begriffs MAPK verwendet
MLK	Mixed-Lineage Kinase
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MTT(Reagenz)	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
mut	Mutante
n	Anzahl der Proben
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF-κB	nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
p	Plasmid, auch: p-Wert (Statistik), auch: Phosphat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert, potentia Hydrogenii
PKA	Proteinkinase A
POSH	Plenty of SH ₃
PP _i	Pyrophosphat
PP-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RISC	RNA-Induced silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natrium (sodium)-Dodecylsulfat
sec.	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SH ₃	Src-Homology 3
siRNA	Small-Interferenz-Ribonukleinsäure
STE	Saccharose-Tris-EDTA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
TNE	Tris-NaCl-EDTA
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1 und 2	TNF-Rezeptor 1 und 2
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
TORC	transducer of regulated CREB (weiterer Name für TORC ist CRTC)
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziertes-Todesdomänen-Protein
TRAF2, 6	TNF-Rezeptor-assoziierter-Faktor 2 bzw. 6
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 80	Polyoxyethylen-Sorbit-Monooleat
T-Zellen	T-Lymphozyten
U	Unit(s)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
ZAK	Zipper Sterile- α -Motif Kinase
ZPK	Leucine-Zipper Proteinkinase

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnr.	Titel	Seite
1.1	Modell der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1	2
1.2	Modell der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2	3
1.3	Modell der Apoptoseinduktion	6
1.4	Transaktivierung der CRE-/CREB-vermittelten Gentranskription in der Betazelle	8
1.5	Primärstruktur der DLK	11
1.6	Modell der MAP-Kinasen-Kaskade	12
1.7	Übersicht über die Wirkung von TNF- α und IL-1 β im Diabetes mellitus Typ 1 und 2	16
3.1	Nachweis endogener DLK in HIT-T15-Zellen	54
3.2 A	Schematische Darstellung des Reporter-gen-Plasmids p4xSomCRET81Luc	55
3.2 B	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGal4-CREBfl und des Reporter-gen-Plasmids p5xGal4E1BLuc	55
3.3	Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription	57
3.4	Wirkung ansteigender Konzentrationen von TNF- α auf die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription	58
3.5	Die Wirkung von TNF- α auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von Wildtyp-DLK, DLK-Mutante oder Bluescript	60
3.6	Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von DLKmut oder BS	62
3.7 A	Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CREB-abhängige Gentranskription	63
3.7 B	Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β auf die durch Forskolin-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription	64
3.8 A	Wirkung von TNF- α auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription	66

Abbildungsnr.	Titel	Seite
3.8 B	Wirkung von IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription	67
3.9 A	Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit TNF- α	69
3.9 B	Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit TNF- α	70
3.10 A	Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit IL-1 β	71
3.10 B	Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit IL-1 β	72
3.11 A und B	Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf das Betazellüberleben	74
3.12 A und B	Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf das Betazellüberleben	76
3.13	Mikroskopische Bilder von HIT-T15-Zellen im Fluoreszenzlicht und im Durchlicht	78
3.14	Konzentrationsabhängige Wirkung von Cyclosporin A auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	79
3.15	Wirkung von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von TNF- α auf die Betazellapoptose	81
3.16 A	Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose	82
3.16 B	Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	83
3.17 A	Zeitabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose	84
3.17 B	Zeitabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	85
3.18	Wirkung von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von IL-1 β auf die Betazellapoptose	86
3.19 A	Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose	87
3.19 B	Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	88

Abbildungsnr.	Titel	Seite
3.20 A	Zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose	89
3.20 B	Zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp	90
4.1	Modell eines sich selbst verstärkenden Regelkreises der Aktivierung von DLK und JNK, ausgelöst durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β	107
4.2	Modellvorschlag, wie TNF- α über Induktion einer Dysfunktion und Apoptose von Betazellen zur Entstehung von Diabetes mellitus beiträgt	109
4.3	Modellvorschlag, wie IL-1 β über Induktion einer Dysfunktion und Apoptose von Betazellen zur Entstehung von Diabetes mellitus beiträgt	111
Tabellennr.	Titel	Seite
2.1	Übersicht über eingesetzte Nucleinsäuren in den Assays	25
2.2	Darstellung aller verwendeten Zellkulturschalen	37
2.3	Übersicht über den Einsatz von Reagenzien in den Assays	44
2.4	Liste der eingesetzten Antikörper	50
3.1	Beeinflussung der CRE-abhängigen Gentranskription durch DLKwt oder DLKmut	59
3.2	Übersicht über die eingesetzten Antikörper und die dargestellte Fluoreszenz	78

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist zu einer weltweit stark zunehmenden Erkrankung geworden. Im Jahr 2000 waren geschätzt 171 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, insgesamt geht man von weltweit 366 Millionen Diabetikern im Jahr 2030 und einer Verdopplung der Todesfälle durch Diabetes zwischen 2005 und 2030 aus (Wild et al. 2004, Kahn et al. 2006). Neuere Gesundheitsstudien zeigen, dass die Hochrechnung für das Jahr 2030 schon aktuell durch die Realität übertroffen wird, denn im Jahr 2008 wurde die Anzahl der Diabetiker weltweit auf 347 Millionen geschätzt (Danaei et al. 2011).

Obwohl 80 % der Todesfälle durch Diabetes in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen auftreten, steht Diabetes auch in Deutschland mit ca. 14.300 Toten im Jahr 2008 auf Platz 13 der Todesursachenstatistik (Statistisches Bundesamt und Robert Koch-Institut 2008). Die Prävalenz von Diabetes steigt mit zunehmendem Alter deutlich an, auf über 20 % der über 70jährigen. Zusätzlich treten bei langjährigem Diabetes die Komplikationen der Makro- und Mikroangiopathie auf, wie die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die arterielle Verschlusskrankheit von Hirnarterien und der ischämische Hirninfarkt, die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie und die diabetische Neuropathie. Diese Komplikationen tragen stark zur erhöhten Mortalität bei (Herold et al. 2009, Rathman et al. 2013). Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, beruhend auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin. Es werden mehrere Formen von Diabetes unterschieden, die häufigsten Formen sind Diabetes mellitus Typ 2 mit 90 - 95 % und Diabetes mellitus Typ 1 mit etwas weniger als 10 % (Stumvoll et al. 2005, American Diabetes Association 2008, WHO 2009).

Diabetes mellitus Typ 1 ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindes- und Jugendalter. In Deutschland sind geschätzt 30.000 der unter 19-jährigen Kinder und Jugendlichen an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankt, die Inzidenz ist deutlich ansteigend (Rathman et al. 2013). Bei Diabetes mellitus Typ 1 werden die Insulin-produzierenden pankreatischen Betazellen zerstört, daraus folgt ein absoluter Insulinmangel, der durch Insulinsubstitution ausgeglichen werden muss. Sehr selten ist diese Betazellzerstörung idiopathisch bedingt. Am häufigsten werden die Betazellen durch eine autoimmune Reaktion zerstört. Eine polygenetische Prädisposition zusammen mit Umwelt-Triggern sorgt für die Entstehung von Autoantikörpern unter anderem gegen Insulin und Inselzellen. Es kommt zu einer Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit T-Zellen und Makrophagen, Insulitis

genannt. Die Zerstörung der Betazellen erfolgt durch die Apoptose, den programmierten Zelltod. Dabei wird vermutet, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β (Interleukin-1Beta), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha) und IFN- γ (Interferon-Gamma) zur Induktion einer Betazellapoptose beitragen können (Atkinson und Eisenbarth 2001, Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003).

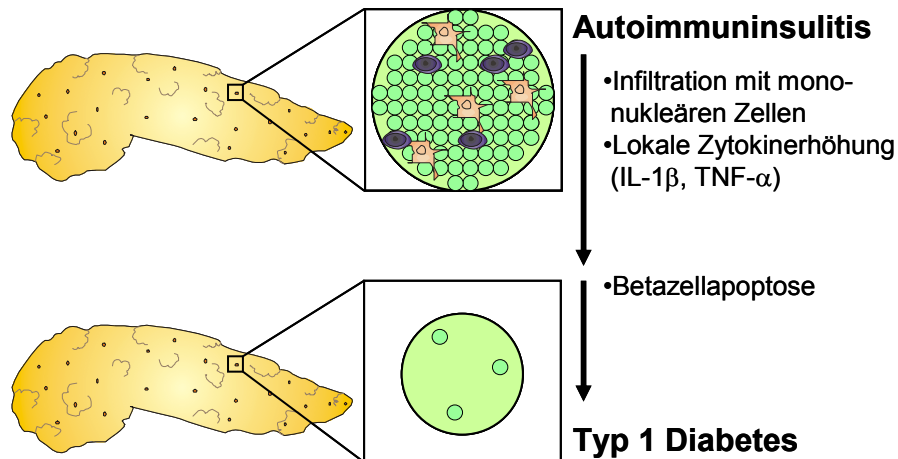


Abb. 1.1: Modell der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 (Modifiziert nach Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003, Rhodes 2005). Vergrößert abgebildet ist eine Langerhans'sche Insel des endokrinen Pankreas. Eine autoimmune Infiltration mit mononukleären Zellen wie T-Lymphozyten und Makrophagen entsteht. Zytokine, aber auch T-Zellen induzieren eine Betazellapoptose, ein absoluter Insulinmangel entsteht, es kommt zum offenen Diabetes mellitus Typ 1.

Über 90 % der Patienten haben jedoch Diabetes mellitus Typ 2, bei dieser Form liegt ein relativer Insulinmangel vor und sie wird zu einem großen Teil erst im Erwachsenenalter manifest (Stumvoll et al. 2005, WHO 2009). Die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 ist aber auch im Kindesalter ansteigend, im Jahr 2013 waren in Deutschland geschätzt 5000 Kinder betroffen (Rathman et al. 2013). Typ 2-Diabetes ist mit dem metabolischen Syndrom assoziiert, zu dessen Ursachen die Adipositas zählt (Mokdad et al. 2003). Mit der steigenden Überernährung und Adipositas steigt auch die Zahl der Typ 2-Diabetiker. Circa ein Drittel der Adipösen entwickelt einen Typ 2-Diabetes, was auf ein Zusammenspiel aus polygenetisch vererbter Prädisposition und dem Erwerb von Risikofaktoren zurückzuführen ist (Rhodes 2005). Adipositas ist mit einer Resistenz der peripheren Gewebe (Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber) für Insulin assoziiert. Durch die Insulinresistenz kommt es zu einer verminderten Aufnahme von Glukose in Muskeln und Fettgewebe, Anstieg der Lipolyse im Fettgewebe und erhöhter Glukoseproduktion in der Leber, als Folge entsteht eine Hyperglykämie und eine Erhöhung freier Fettsäuren (Saltiel und Kahn 2001).

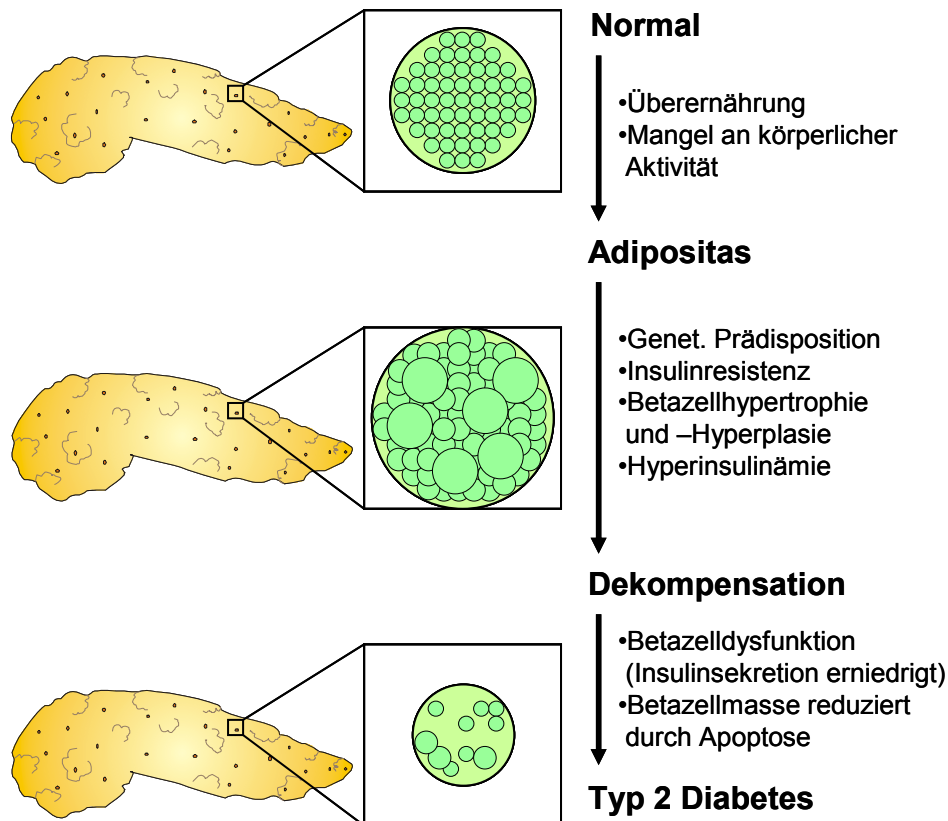


Abb. 1.2: Modell der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 (Modifiziert nach Rhodes 2005). Vergrößert abgebildet ist eine Langerhans'sche Insel des endokrinen Pankreas. Durch Überernährung und Aktivitätsmangel entsteht Adipositas. Dies führt zur Insulinresistenz peripherer Gewebe. Gegenregulatorisch wird die Betazellfunktion und -masse erhöht, es entsteht eine Hyperinsulinämie. Schließlich kommt es zur Dekompensation mit Betazelldysfunktion und Apoptose, was zur Abnahme der Betazellmasse führt. Typ 2-Diabetes mit einem relativen Insulinmangel entsteht.

Der prädiabetische Zustand mit Insulinresistenz und verminderter Glukosetoleranz kann durch die Plastizität der Insulin-produzierenden Betazellen ausgeglichen werden. Der Körper reagiert mit einer Zunahme der Betazellfunktion und der Betazellmasse. Die Insulinsekretion wird auf das 4- bis 5-Fache gesteigert, die Betazellmasse nimmt um bis zu 50 % zu (Rhodes 2005, Kahn et al. 2006). Es entsteht eine Hypertrophie und Hyperplasie der Betazellen mit einer Hyperinsulinämie. Schließlich kommt es zu einer Dekompensation der Betazellen mit einer Verminderung der Betazellfunktion und -masse, die zur Entstehung des Typ 2-Diabetes führt. Die progressive Zerstörung der Betazellen geschieht durch Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Butler et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003, Rhodes 2005).

1.2 Apoptose

Sowohl bei Diabetes mellitus Typ 1 als auch bei Typ 2 wird der Tod der Betazellen durch den Mechanismus der Apoptose vermittelt (Atkinson und Eisenbarth 2001, Mandrup-Poulsen 2001, Butler et al. 2003).

Zu den verschiedenen Arten von Zelltod gehören die Nekrose und die Apoptose. Bei dem „ungeplanten“ Zelltod, der Nekrose, kommt es zu einem Anschwellen der Zellen, was zu einer Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Zellinhalts führt. Die so freigesetzten zellulären Enzyme führen zu einer Entzündungsreaktion mit Gewebeschädigungen (Krammer 2000).

Viele physiologische Prozesse benötigen einen besser kontrollierbaren Zelltod, der mit weniger Gewebeschädigung einhergeht. Bei der Teilung von Finger- und Zehenstrahlen, für die Regulierung der Zellteilung und um eine konstante Zellmasse zu erhalten, ist eine Zellapoptose notwendig. Des Weiteren wird im Immunsystem die Apoptose zur Entfernung autoreaktiver T-Zellen oder nicht funktionsfähiger B-Zellen eingesetzt (Saikumar et al. 1999, Krammer 2000). Kerr et al. prägten 1972 den Begriff Apoptose, er stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Herabfallen der Blütenblätter von Blumen oder der Blätter von Bäumen“. Die Apoptose ist ein hochgradig konservierter Mechanismus in der Evolution (Birge und Ucker 2008). Es kommt zu typischen morphologischen Veränderungen, die apoptotischen Zellen schrumpfen, Zellorganellen und Chromatin werden kondensiert. Die DNA wird durch Endonukleasen in charakteristischer Weise gespalten. Anschließend bilden sich Zellausstülpungen und membranumschlossene Säckchen werden abgetrennt. Diese apoptotischen Körperchen werden phagozytiert. Damit kommt es zum selektiven, programmierten Untergang einer Zelle ohne umliegende Entzündungsreaktion (Kerr et al. 1972, Saikumar et al. 1999, Krammer 2000).

Die Apoptose wird in den Zellen durch eine Signalkaskade, bestehend aus speziellen Proteasen, den Caspasen, vermittelt. Der Name Caspase entstand dadurch, dass Caspasen Cystein-abhängig nach einem Asparat ihr Substrat als Protease zerschneiden. Caspasen liegen als inaktive Zymogene (Procaspasen) im Zytoplasma vor und werden durch ihre Spaltung in eine kleine und eine große Untereinheit aktiviert. Dabei spalten übergeordnete Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8, -9, -10) untergeordnete Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3). Aktiviert bilden Caspasen aus zwei großen (α) und zwei kleinen (β) Untereinheiten ein Tetramer mit der Symmetrie $\alpha\beta\alpha$. Aktivierte Caspase-3 aktiviert wiederum Apoptose-Effektoren und besiegelt damit die Apoptose der Zelle (Enari et al. 1998, Hui et al. 2004, Pop und Salvesen 2009).

Die Apoptoseinduktion kann über zwei verschiedene Signalkaskaden vermittelt werden, die beide in der Aktivierung von Caspasen münden. Je nachdem welche Signalkaskade überwiegt, teilt man die Zellen in Typ-1- und Typ-2-Zellen ein. Typische Typ-1-Zellen sind

z.B. periphere T-Lymphozyten, ein typisches Typ-2-Gewebe ist die Leber (Scaffidi et al. 1998). In beiden Zelltypen wird die Apoptose durch extra- oder intrazelluläre Stimuli aktiviert. Extrazellulär können Liganden an sog. Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche binden. T-Zellen können über FasL (FasLigand) den Todesrezeptor Fas (auch CD95 genannt) aktivieren, TNF- α kann den Todesrezeptor TNF-R1 aktivieren. Über die intrazelluläre Todesdomäne der Rezeptoren werden die Adapter TRADD (an TNF-R1) und FADD (an Fas) gebunden. TRADD kann wiederum mit FADD interagieren. Der Komplex aus Adapter FADD und Rezeptor Fas wird DISC (Death-Inducing-Signaling-Complex) genannt. DISC überführt die Procaspasen-8 und -10 in die aktiven Caspasen-8 und -10. Die Menge aktiver Caspase-8 hat eine Weichenstellung inne: Wird viel Caspase-8 aktiviert, läuft eine Reaktion der Typ-1-Zellen ab, wird wenig Caspase-8 aktiviert, läuft eine Typ-2-Zellen-Reaktion ab (Scaffidi et al. 1998). In Typ-1-Zellen aktiviert Caspase-8 die Effektorcaspase-3, die die Apoptose auslöst.

In Typ-2-Zellen, in denen wenig Caspase-8 aktiviert wird, ist ein Verstärkungsmechanismus durch „Aktivierung“ von Mitochondrien notwendig. Dies geschieht durch Spaltung des Proteins BID durch Caspase-8. BID aktiviert die Mitochondrien. An der äußeren Mitochondrienmembran liegt das antiapoptotische Protein Bcl-2, das Cytochrom C (Cyt C) an der inneren Mitochondrienmembran gebunden hält. BID erhöht die Permeabilität der Mitochondrienmembran, öffnet mitochondriale Poren und setzt Cytochrom C ins Zytoplasma frei. Dort bildet Cytochrom C durch Bindung an das Protein Apaf-1 das sogenannte Apoptosom und aktiviert Caspase-9. Caspase-9 kann wie Caspase-8 die Caspase-3 aktivieren. Caspase-3 aktiviert verschiedene Apoptose-Effektoren: Aktin und Fodrin führen zur Schrumpfung und Kondensation der Zelle sowie zu Membranausstülpungen. Zusätzlich aktiviert Caspase-3 die Endonuklease CAD (Caspase-Aktiviert-DNAse), die die DNA in Fragmente zerteilt und dadurch abbaut. Damit markiert die Caspase-3 einen nicht mehr umzukehrenden Punkt in der Apoptoseinduktion (Enari et al. 1998, Scaffidi et al. 1998, Saikumar et al. 1999, Krammer 2000, Mandrup-Poulsen 2001, Mathis et al. 2001).

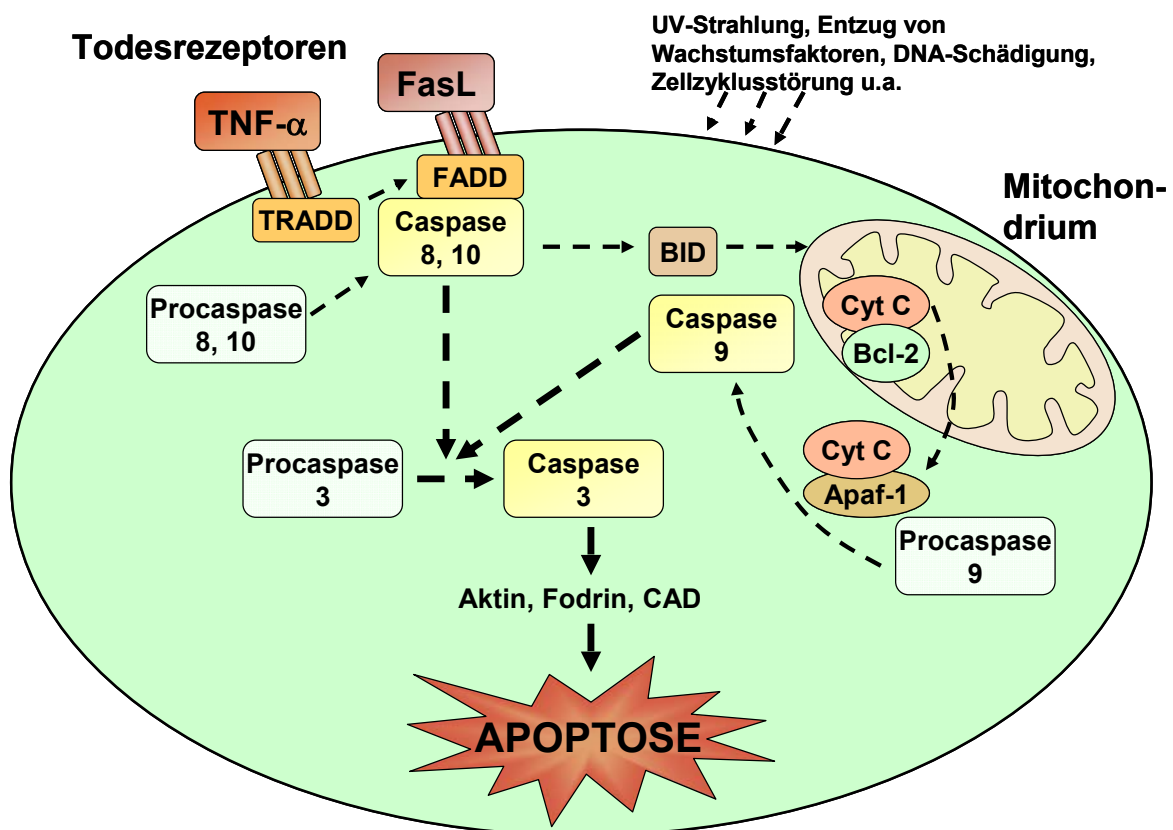


Abb. 1.3: Modell der Apoptoseinduktion (Modifiziert nach Scaffidi et al. 1998, Saikumar et al. 1999, Krammer 2000, Mandrup-Poulsen 2001, Hui et al. 2004). Extra- und intrazelluläre proapoptotische Signale können die Todesrezeptoren aktivieren. Dabei bindet TNF- α an den TNF-R1, der TRADD bindet. FasL bindet an den Fas-Rezeptor, der FADD bindet. Das Protein TRADD kann mit FADD interagieren. Der Fas-Rezeptor und FADD bilden den Death-Inducing-Signaling-Complex (DISC) und aktivieren die Caspasen-8 und -10. Diese können direkt Caspase-3 aktivieren, die die Apoptose auslöst. Wenn zu geringe Mengen Caspase-8 aktiviert werden, werden über Spaltung des Proteins BID die Mitochondrien aktiviert. Dort vermittelt normalerweise das antiapoptotische Protein Bcl-2, dass Cytochrom C (Cyt C) an der Mitochondrienmembran verbleibt. Nach Aktivierung des mitochondrialen Weges der Apoptose wird Cytochrom C ins Zytoplasma freigesetzt und bindet Apaf-1, zusammen können sie Caspase-9 aktivieren. Caspase-9 kann wie Caspase-8 die Caspase-3 aktivieren. Caspase-3 vermittelt über Apoptose-Effektoren wie Aktin und Fodrin ein Schrumpfen der Zelle und Membranabschnürung, über die Caspase-Aktivierte-DNAse (CAD) wird die DNA degradiert. Damit stirbt die Zelle durch Apoptose ab.

Fehlgesteuerte, d.h. überschießende oder verminderte Apoptose hat Bedeutung in der Entstehung verschiedener Erkrankungen, z.B. Autoimmunerkrankungen, dem ungesteuerten Wachstum von Tumoren, lymphoproliferativen Erkrankungen, Neurodegeneration aber auch in Form gesteigerter Lymphozytenapoptose bei der Immunschwächekrankheit AIDS (Saikumar et al. 1999, Krammer 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptose pankreatischer Betazellen, die zu einer Reduktion der funktionsfähigen Betazellmasse führt, sowohl im autoimmun vermittelten Typ 1-Diabetes als auch im Typ 2-Diabetes eine wichtige Rolle spielt (Mandrup-Poulsen 2001, Mathis et al. 2001, Hui et al. 2004). Zu den die Apoptose aktivierenden Mechanis-

men in Betazellen gehören neben zytotoxischen T-Zellen, Lipotoxizität durch erhöhte freie Fettsäuren und Glukosetoxizität auch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (Hui et al. 2004, Jambal et al. 2003). Die Signaltransduktion der Zytokine erfolgt über Bindung an spezifische Rezeptoren und Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, die unter anderem Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinasen umfassen könnte (Hui et al. 2004). Die Zytokine IL-1 β und TNF- α können die MAP-Kinase JNK aktivieren und könnten zu einer Apoptose führen (Ammendrup et al. 2000, Donath et al. 2003, Abdelli et al. 2007). Der genaue molekulare Mechanismus bleibt weiter zu untersuchen.

1.3 Das cAMP-Responsive-Element (CRE)-bindende Protein

CREB

CREB ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der wichtig für das Überleben von Betazellen ist (Jhala et al. 2003).

CREB reguliert die Transkription vieler Gene, die eine CRE-Sequenz enthalten (Rudolph et al. 1998). Für die CREB-vermittelte Gentranskription sind verschiedene Voraussetzungen notwendig. Durch die Leucin-Zipper-Domäne kann CREB als Dimer an Gene mit dem cAMP-Responsiven-Element CRE binden. In Betazellen führt Glukose über das Schließen von Kaliumkanälen zu einer Membrandepolarisation, die zu Calciumeinstrom durch die spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle und Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt, wodurch die Freisetzung von Insulin aus Speichervesikeln stimuliert wird. Der intrazelluläre Calciumanstieg führt zusätzlich zur Aktivierung von Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinasen (Cam-Kinasen), die CREB am Serin 119 (in CREB-327, bzw. an Serin 133 in CREB full length) phosphorylieren. Diese Membrandepolarisation kann experimentell durch Erhöhung von extrazellulärem Kaliumchlorid (KCl) simuliert werden. Zusätzlich führt die intrazelluläre Erhöhung von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die ebenfalls CREB am Serin 119 phosphoryliert. Dies kann in Experimenten durch einen Aktivator der Adenylatcyclase (Forskolin) simuliert werden (Oetjen et al. 1994, Rudolph et al. 1998, Jhala et al. 2003, Oetjen et al. 2003b). An phosphoryliertes CREB kann der CREB-Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein) rekrutiert werden. CBP kann die CREB-abhängige Gentranskription stimulieren (Oetjen et al. 2005). TORC (transducer of regulated CREB, auch CRTC = CREB regulierender transkriptioneller Koaktivator genannt) ist ein weiterer Koaktivator von CREB. Vier Moleküle von TORC interagieren zusammen und unabhängig von der CREB-Phosphorylierung mit DNA-gebundenem CREB und können ebenfalls die Gentranskription stimulieren (Phu et al. 2011).

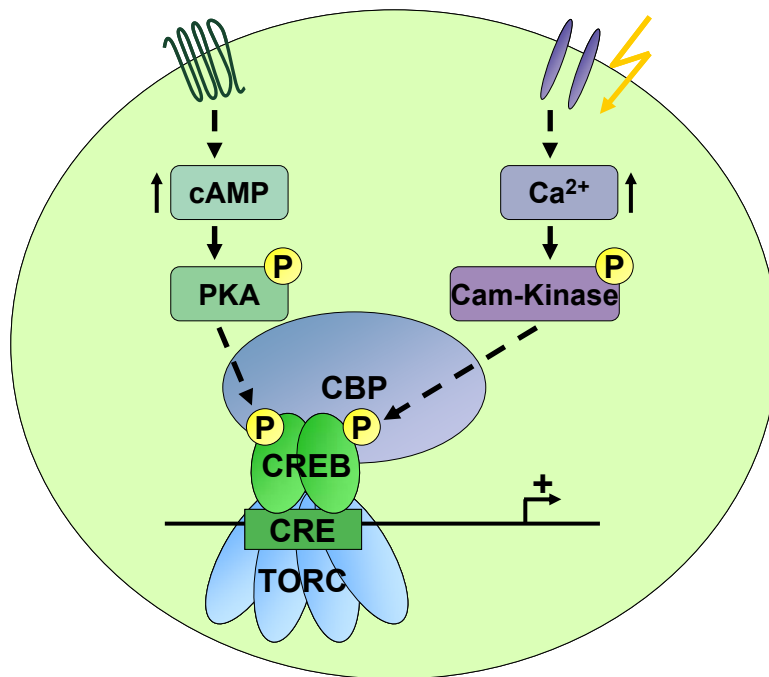


Abb. 1.4: Transaktivierung der CRE-/CREB-vermittelten Gentranskription in der Betazelle (Modifiziert nach Oetjen et al. 2003a, b, Phu et al. 2011). CREB bindet als Dimer über einen Leucin-Zipper an das CRE-Element in Genen. Erhöhung intrazellulärer cAMP-Level führt zu Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), diese phosphoryliert CREB an Serin 119. Membrandepolarisation führt zu intrazellulärer Calciuserhöhung, dadurch werden Calcium-Calmodulin (Cam)-abhängige Kinasen aktiviert, die ebenfalls CREB an Serin 119 phosphorylieren. An phosphoryliertes CREB kann der Koaktivator CREB-bindendes Protein (CBP) binden und die CRE-abhängige Gentranskription stimulieren. Als weitere Koaktivatoren können vier Proteine TORC unabhängig von der Phosphorylierung mit CREB interagieren.

Es konnte gezeigt werden, dass CREB eine zentrale Rolle in Funktionen wie Gedächtnis und Lernen, T-Zell-Entwicklung und Aktivierung spielt. CREB-knock-out-Mäuse versterben kurz nach der Geburt (Rudolph et al. 1998). CREB ist wichtig für das von Wachstumsfaktoren abhängige Zellüberleben (Mayr und Montminy 2001). Auch in pankreatischen Betazellen ist CREB wichtig für das Zellüberleben: Mäuse mit einer dominant-negativen CREB-Mutante in Betazellen haben bis zu 70 % Verlust an Betazellmasse, die Apoptose wird induziert (Jhala et al. 2003). Auch bei Diabetes mellitus liegt eine Betazellapoptose vor, daher könnte die CREB-abhängige Gentranskription einen wichtigen betazellprotektiven Signalweg darstellen. Mäuse mit einer dominant negativen Mutante von CREB entwickeln eine Glukoseintoleranz und werden diabetisch (Jhala et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass CREB an die Erkennungsregion im Ratten-Insulin-I-Gen und an den humanen Insulingenpromotor bindet und die transkriptionelle Aktivität stimuliert. Das humane Insulingen enthält vier Kopien der CRE-Sequenz und die Insulingentranskription wird durch CREB reguliert. Die Produktion und Sekretion von Insulin ist eine der wichtigsten Funktionen der Betazellen. CREB ist also wichtig für Funktion und

Überleben der pankreatischen Betazellen. Unter der Arbeitshypothese, dass CREB-hemmende Signale zu einer Betazell dysfunktion und zum Entstehen von Diabetes beitragen könnten, soll die Regulation der CRE- und CREB-vermittelten Gentranskription in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

1.4 Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes durch Cyclosporin A und die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK)

Das Medikament Cyclosporin A (CsA) stammt aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* und ist ein lipophiles zyklisches Polypeptid. Seit 1976 die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A entdeckt wurde (Borel et al. 1976), wird es weit verbreitet zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Knochenmarktransplantationen sowie in der Therapie von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. CsA wirkt immunsuppressiv, indem es die Aktivierung von T-Zellen hemmt. CsA bindet an seinen spezifischen intrazellulären Rezeptor Cyclophilin. Der Komplex aus CsA und Cyclophilin hemmt die Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin. Dadurch bleibt die Aktivierung der T-Zellen aus (Schreiber und Crabtree 1992, Matsuda und Koyasu 2000).

Trotz der guten immunsuppressiven Wirkung von CsA gibt es zahlreiche Nebenwirkungen. Dazu gehören Nephrotoxizität, Neurotoxizität, arterieller Hypertonus und Hepatotoxizität. CsA kann weiterhin zu einer Störung der Glukosetoleranz und zum Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes mellitus führen (U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group 1994, Chadban 2008). In klinischen Studien führt die Behandlung organtransplanter Patienten mit CsA in 26 % zum Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes innerhalb der ersten 6 Monate (Vincenti et al. 2007). CsA wirkt diabetogen, indem es zu verminderter Insulinfreisetzung aus pankreatischen Betazellen, zu verminderten Seruminsulinspiegeln und zu entsprechend erhöhten Blutglukosespiegeln führt. In den Betazellen mit CsA behandelte Ratten konnten auch morphologische Veränderungen wie Zellhydrops, zytoplasmatische Vakuolisierungen, Degranulation und Kernpyknose bis hin zum Betazelltod festgestellt werden (Helmchen et al. 1984, Penforis und Kury-Paulin 2006).

Auf molekularer Ebene könnte CsA über die Beeinflussung der CREB-abhängigen Gentranskription seine diabetogene Wirkung entfalten. CREB schützt Betazellen vor einer Apoptose, ist an der Regulation der Transkription des humanen Insulins beteiligt und ist daher für Funktion und Überleben von Betazellen wichtig (Jhala et al. 2003, Oetjen et al. 2003a, b). Für die CREB-abhängige Gentranskription ist auch der Koaktivator CBP notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Phosphatase Calcineurin die transkriptionelle Aktivität von CBP verstärkt wird. CsA wirkt als Calcineurin-Inhibitor und

hemmt die Aktivität der CREB-abhängigen Gentranskription auf dem Level des Koaktivators CBP (Oetjen et al. 2005). Inkubation mit CsA führt zu einem verminderten Überleben von Betazellen, genauer einer Betazellapoptose. Dafür spielt die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase DLK eine wichtige Rolle: Überexpression von DLK führt zu einer Betazellapoptose und verstärkt die durch CsA induzierte Apoptose (Plaumann et al. 2008). Die Regulation der DLK durch CsA lässt vermuten, dass die DLK Calcineurin-abhängig ist. Die Phosphatase Calcineurin kann die DLK dephosphorylieren und damit inaktivieren. Hemmung von Calcineurin, wie z.B. durch CsA, vermindert die Dephosphorylierung der DLK in Neuronen und verstärkt den Anteil aktiver DLK (Mata et al. 1996, Plaumann et al. 2008). Auch in pankreatischen Betazellen konnte gezeigt werden, dass die DLK Calcineurin-sensitiv ist (Oetjen et al. 2006, Plaumann et al. 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DLK die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription hemmt (Oetjen et al. 2006).

Das Immunsuppressivum CsA könnte mittels Hemmung von Calcineurin zu einer verstärkten Aktivität der DLK führen, die DLK könnte über Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription zu einer Funktionsschädigung und Apoptose von Betazellen führen. So könnte Behandlung mit CsA zu einem Posttransplantationsdiabetes führen.

Auch im klassischen Diabetes mellitus werden die Betazellen durch Apoptose zerstört, daher könnte die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription durch die DLK auch für das Entstehen von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 eine wichtige Rolle spielen.

1.5 Wirkung der DLK und der c-Jun-N-terminalen Kinase JNK

Holzman et al. konnten 1994 erstmalig die DLK (Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase) beschreiben. In embryonalen Mäusen konnten verschiedene Proteinkinasen identifiziert werden, darunter stellt das Protein DLK ein neues Genprodukt dar. Die DLK kann in Geweben von Gehirn, Nieren, Lunge, Herz, Haut, Darm und Pankreas nachgewiesen werden. DLK ist ein Polypeptid aus 888 Aminosäuren mit einer apparenten molekularen Masse von 130 kDa. Sie gehört zur Gruppe der Mixed Lineage-Kinasen (MLK). MLKs sind für die Signaltransduktion in Nervenzellen, im Immunsystem aber auch für Überleben und Reifung von dendritischen Zellen wichtig (Mata et al. 1996, Handley et al. 2007). Es gibt acht in Säugetieren vorkommende MLKs, die drei Subgruppen zugeordnet werden können: 1.) die MLK 1 - 4, 2.) die DLK und die LZK (Leucin-Zipper-Bearing Kinase) und 3.) die ZAKs (Zipper Sterile- α -Motif Kinases) (Leung und Lassam 1998, Handley et al. 2007). Der Name Mixed Lineage-Kinasen beruht darauf, dass alle Proteinkinasen dieser Klasse die Primärstruktur sowohl von Serin/Threonin-Kinasen als auch von Tyrosin-Kinasen ent-

halten. Des Weiteren besitzen alle MLK-Proteinkinasen C-terminal der katalytischen Domäne ein oder zwei Leucin-Zipper-Motive, die durch ein kurzes Zwischensegment getrennt sind (Holzman et al. 1994, Fan et al. 1996). Entsprechend der DLK existiert ein humanes Homolog, die LZK (Leucin-Zipper-Bearing Kinase). Die katalytische Domäne und die Leucin-Zipper-Domänen der DLK und der LZK sind zu mehr als 90 % identisch (Nihalani et al. 2000). Die katalytische Domäne der DLK ist funktionell eine Serin/Threonin-Kinase, C-terminal besitzt sie zwei Leucin-Zipper, die durch ein 25 Aminosäuren langes Zwischensegment getrennt sind. Am C-Terminus des Proteins folgt ein Glycin-, Serin- und Prolin-reicher Bereich und am N-Terminus liegt ein Glycin- und Prolin-reicher Bereich (Holzman et al. 1994).

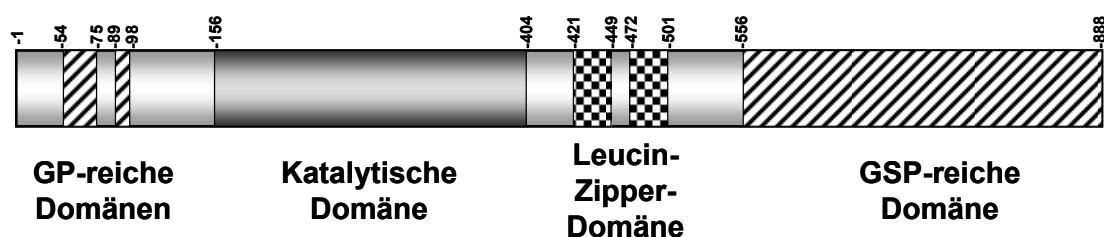


Abb. 1.5: Primärstruktur der DLK (modifiziert nach Holzman et al. 1994). Die DLK (Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase) besteht aus 888 Aminosäuren. Sie gehört zur Familie der Mixed Lineage-Kinasen (MLK). C-Terminus liegt eine Glycin- und Prolin-reiche (GP) Region, dann folgt die katalytische Domäne, die sowohl die Primärstruktur von Serin/Threonin- als auch von Tyrosin-Kinasen enthält, aber funktionell eine Serin/Threonin-Kinase ist. Anschließend folgen zwei durch ein kurzes Zwischensegment getrennte Leucin-Zipper, die charakteristisch für die DLK sind. N-Terminus liegt eine Glycin-, Serin- und Prolin-(GSP)reiche Region.

Die MLKs, so auch die DLK, sind mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP3K). Es gibt drei Subfamilien von Säugetier-MAP-Kinasen: ERK (Extracellular-Signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun-N-terminal Kinases, sie entsprechen den SAPK = Stress-Activated Protein Kinases) und p38-Kinasen (Merritt et al. 1999, Handley et al. 2007). Die Kinasen vom JNK-Typ können durch Zellstress-induzierende Signale wie UV-Strahlung, Hitzeschock, Hyperosmolarität, Ischämie, Axonschädigung in Neuronen und proinflammatorische Zytokine aktiviert werden (Nihalani et al. 2003). Über MAP-Kinasen wie JNK werden viele extrazelluläre Signale weitergeleitet, sie spielen eine Rolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Xu et al. 2001). Die Signalkaskade der MAP-Kinasen besteht mindestens aus drei einander untergeordneten Kinasen: Eine MAP3K phosphoryliert eine untergeordnete MAP2K (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase, wird auch als MKK bezeichnet) und diese aktiviert eine MAP-Kinase (MAPK), deren Substrate z.B. Transkriptionsfaktoren sind (Nihalani et al. 2003). Die DLK konnte die MAP2K, MKK7 und MKK4 aktivieren, MKK7 und MKK4 wiederum führen zur Aktivierung der MAPK JNK (Merritt et al. 1999, Handley et al. 2007).

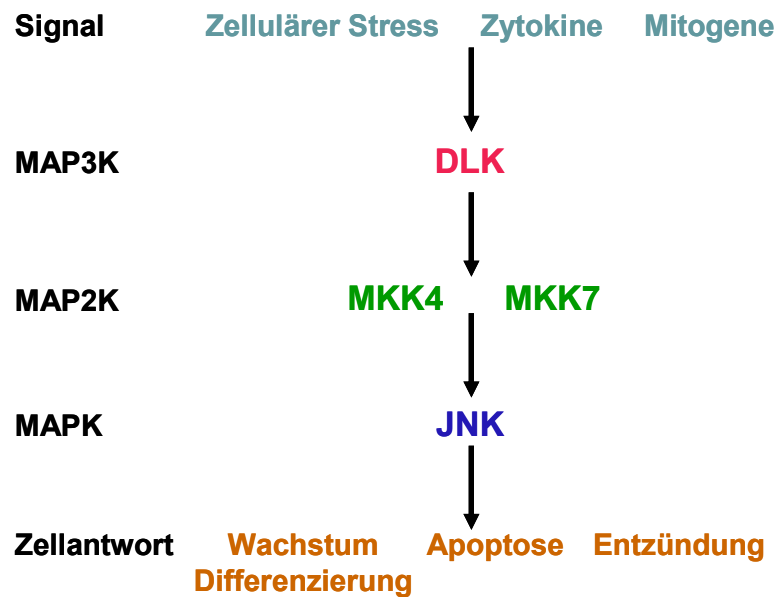


Abb. 1.6: Modell der MAP-Kinasen-Kaskade (Modifiziert nach Merritt et al. 1999, Ammendrup et al. 2000, Nihalani et al. 2003, Abdelli et al. 2007, Handley et al. 2007). Extrazelluläre Signale wie Zellstress, Zytokine oder Mitogene könnten MAP3K (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase) wie die DLK aktivieren. Diese aktivieren die untergeordneten MAP2K, MKK4 und MKK 7, die wiederum die MAPK JNK aktivieren. JNK phosphoryliert dann Substrate wie Transkriptionsfaktoren, über die Prozesse wie Wachstum/Differenzierung, Apoptose oder Entzündung ausgelöst werden.

Die DLK kann in Neuronen in einer zytoplasmatischen und einer an der Plasmamembran assoziierten Form sowie in einer nukleären Form dargestellt werden (Mata et al. 1996, Merritt et al. 1999). Die DLK wird auch in pankreatischen Betazellen und primären Inseln der Maus exprimiert (Oetjen et al. 2006). Unter basalen Bedingungen könnte DLK als inaktives Monomer vorliegen. Eine Protein-Protein-Interaktion scheint notwendig für die Entfaltung der DLK-Wirkung zu sein. Die DLK kann mit weiteren DLK-Molekülen über die Leucin-Zipper Homodimere bilden. Die Homodimerisierung scheint notwendig für die folgende Autophosphorylierung und Aktivierung der DLK sowie für die Aktivierung von JNK durch die DLK zu sein (Leung und Lassam 1998, Nihalani et al. 2000). Für die katalytische Aktivität der DLK ist das Lysin an Position 185 in der ATP-Bindungsstelle entscheidend. Wird es mit einer Punktmutation durch Alanin ersetzt, kann ATP nicht stabil gebunden werden und es entsteht die inaktive DLK-Mutante K185A. Die Bildung von Homodimeren ist nicht von der katalytischen Aktivität abhängig, da auch die Kinase-tote Mutante K185A Dimere bilden kann (Mata et. al 1996).

In dem Mechanismus der Aktivierung von DLK und JNK spielen neben der Phosphorylierung sogenannte Adapter-Proteine eine entscheidende Rolle. Unter basalen Bedingungen wird die DLK durch Bindung an das Adapter-Protein JIP (JNK-Interacting-Protein) in ihrer monomeren, unphosphorylierten und damit inaktiven Form gehalten. JIP kann sowohl die DLK als auch JNK binden, doch nicht beide gleichzeitig. Durch Aktivierung von JNK, z.B.

durch Zytokine, phosphoryliert JNK JIP am Thr-103 und wird an JIP gebunden wobei die DLK abdissoziiert. Freie DLK kann Homodimere bilden, phosphoryliert werden und kann in ihrer Eigenschaft als MAP3K eine Signalkaskade auslösen. Aktivierte DLK kann wiederum JNK indirekt phosphorylieren und damit aktivieren, was zu einem sich selbst verstärkenden Regelkreis führen könnte, der eine Apoptose auslösen und weiter verstärken könnte (Nihalani et al. 2000, 2001, 2003, Xu et al. 2001, 2003, 2005). Auch die untergeordnete MAPK JNK selbst scheint eine Rolle in der Betazellschädigung zu spielen. Bei adipösen Mäusen ist JNK erhöht (Hirosumi et al. 2002). JNK vermittelt eine durch oxidativen Stress induzierte Unterdrückung der Insulingenexpression in Betazellen (Kaneto et al. 2002).

Über die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription in Betazellen scheint die DLK bei Behandlung mit CsA zum Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes führen. Es gibt Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass die DLK auch für Schädigung und Apoptose von Betazellen, die zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 führt, wichtig ist. Die DLK führt über die JNK-Signalkaskade in Neuronen zur Apoptose, während eine dominant-negative DLK-Mutante die Neuronen vor dem Zelltod schützen konnte (Xu et al. 2001). In Betazellen führt eine Überexpression der DLK zu einer Apoptose (Plaumann et al. 2008). Auch die Betazellfunktion, wie die Insulingentranskription, wird von der DLK beeinflusst. Die DLK kann die durch Membrandepolarisation stimulierte CREB-abhängige Gentranskription und auch die durch den CREB-Koaktivator CBP vermittelte Gentranskription hemmen (Oetjen et al. 2006). Über die Hemmung von CREB sowie die Induktion einer Betazellapoptose könnte die DLK eine wichtige Rolle in der Entstehung des Diabetes mellitus spielen.

Viele Mechanismen können die Verminderung der Betazellfunktion und die Betazellzerstörung durch Apoptose verstärken, dazu gehören die chronische Hyperglykämie, die chronische Hyperlipidämie und die erhöhte Freisetzung bestimmter Zytokine (Rhodes 2005). Durch Adipositas, chronische Hyperglykämie und Hyperlipidämie wird ein niedriggradiger Entzündungszustand im menschlichen Körper ausgelöst, der z.B. über die erhöhte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β vermittelt wird. Bei fehlender Gegenregulation kann ein klinisch apparenter Diabetes entstehen (Kolb und Mandrup-Poulsen 2010). Obwohl Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 ätiologisch unterschiedliche Krankheiten darstellen, gibt es Hinweise, dass auf der Zellebene ähnliche oder gleiche Signaltransduktionswege die Schädigung der Betazellen vermitteln (Mandrup-Poulsen 2003). Dabei könnte die DLK einen zentralen Angriffspunkt für betazelltoxische Substanzen wie die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β darstellen.

1.6 Interleukin-1Beta (IL-1 β) und Diabetes mellitus

Interleukin-1Beta ist ein proinflammatorisches Zytokin. Auf der Suche nach einem endogenen Fieber produzierenden Protein näherte man sich der heute bekannten Klasse von Interleukinen (IL1-35) immer mehr an. IL-1 β dient der Regulation inflammatorischer Prozesse. Die Blockade der IL-1 β -Signale durch IL-1 β -Antagonisten wird bei autoimmunen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt (z.B. rheumatoide Arthritis). Der inaktive IL-1 β -Vorläufer wird erst durch Caspase-1 (innerhalb der Zelle) oder andere Proteasen (außerhalb der Zelle) in das aktive IL-1 β gespalten und dann freigesetzt (Dinarello 2010). IL-1 β bindet an seinen Rezeptor (IL-1R1), der auch auf pankreatischen Betazellen exprimiert wird (Mandrup-Poulsen 2003). Über Bindung der Kinase IRAK-1 (IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase) wird TRAF6 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor 6) phosphoryliert. Darüber kann IL-1 β den NF κ B-Signalweg oder den MAPK-Signalweg aktivieren (Mandrup-Poulsen 2003, Dinarello 2010). Die Signaltransduktion von IL-1 β kann über MAPK wie JNK erfolgen.

Im durch autoimmune Insulinitis vermittelten Typ 1-Diabetes wird IL-1 β von Makrophagen, die die Langerhans'schen Inseln infiltrieren, produziert und könnte zur Betazellerstörung durch Apoptose beitragen (Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003). Aber auch im mit Adipositas vergesellschafteten Typ 2-Diabetes spielt IL-1 β eine Rolle. Chronisch erhöhte Blutglukosespiegel schädigen die Betazelle im Sinne einer Glukosetoxizität und führen zur Apoptose der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β dabei eine wichtige Rolle spielt, denn unter hyperglykämischen Bedingungen wird IL-1 β von den Betazellen humaner Inseln produziert (Maedler et al. 2002). Dies könnte zu einer Aktivierung von MAPK wie JNK führen und darüber eine Betazellapoptose vermitteln. Auch die Betazellfunktion wird vermindert, denn Glukose-induzierte IL-1 β -Produktion führt zu einem verminderten Insulingehalt der Betazellen (Maedler et al. 2002). IL-1 β reduziert weiterhin die stimulierte Insulingentranskription in der Betazelllinie HIT-T15 und in isolierten murinen Inseln (Oetjen et al. 2007). IL-1 β könnte die Betazellen schädigen und darüber zum Entstehen von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 beitragen.

1.7 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) und Diabetes mellitus

Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei Entzündungen sezerniert wird und die Genexpression sowie die Apoptose von Zellen induzieren kann. 1984 konnte das Zytokin der TNF-Liganden-Familie zugeordnet werden. TNF- α spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn, in deren Therapie auch TNF- α -Inhibitoren eingesetzt werden (O'Neill 2006). TNF- α kann an die TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 binden. TNF-R1 wird im Gegensatz zu TNF-R2 konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert und scheint der wichtigere Rezeptor für die Transduktion von TNF- α -vermittelten Effekten zu sein (Wajant et al. 2003). Der intrazelluläre Anteil des TNF-R1 enthält eine sogenannte Todesdomäne (DD = Death Domain), die bei Aktivierung des Rezeptors durch TNF- α das TNF-Rezeptor-assoziierte-Todesdomänen-Protein TRADD bindet. Daraufhin wird das Protein FADD (Fas-assoziiertes-Todesdomänen-Protein) und dann der Faktor TRAF2 (TNF-Rezeptor-assoziiierter-Faktor 2) gebunden. Nun können die Signalwege über NF κ B oder über MAPK wie JNK aktiviert werden. Dies könnte möglicherweise eine Betazellapoptose auslösen (Wajant et al. 2003, Donath et al. 2003). Bei Diabetes Typ 1 werden TNF- α und IL-1 β von in die Langerhans'schen Inseln eingewanderten Makrophagen produziert und könnten zur Autoimmuninsulinitis und in der Folge zur Apoptose der Betazellen beitragen (Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003). Auch in der Pathogenese von Diabetes Typ 2 spielt TNF- α eine Rolle. In adipösen Mausmodellen wird im Fettgewebe signifikant mehr TNF- α produziert und auch die zirkulierenden TNF- α Werte waren deutlich erhöht im Vergleich zu schlanken Kontrolltieren (Hotamisligil et al. 1993). In adipösen Menschen wird deutlich mehr TNF- α von Adipozyten produziert und die TNF- α Werte im Fettgewebe sowie systemisch waren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. TNF- α vermittelt in adipösen Patienten und Diabetes-Patienten eine Insulinresistenz (Hotamisligil et al. 1995, Plomgaard et al. 2007). Über Aktivierung von JNK wird durch TNF- α das Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS-1) inhibitorisch phosphoryliert, dies kann zu einer Insulinresistenz führen (Hirosumi et al. 2002). Durch TNF- α kann zusätzlich über JNK das Insulin-Rezeptor-Substrat 2 (IRS-2) hemmend phosphoryliert werden, das in aktiver Form wichtig für das Betazellüberleben ist (Hirosumi et al. 2002, Rhodes 2005). In der Betazelllinie MIN6 induziert TNF- α eine Betazellapoptose (Ishizuka et al. 1999). In der Betazelllinie MIN6 konnte eine Mischung aus den Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die phosphorylierte Form des betazellprotektiven Transkriptionsfaktors CREB deutlich vermindern und eine Apoptose auslösen. Eine Überexpression von Wildtyp-CREB schützt vor dem Zytokineinfluss, während Überexpression einer dominant-negativen CREB-Mutante zu einer erhöhten Betazellapoptose führt (Jambal et al. 2003). Des Weiteren können sowohl

TNF- α als auch IL-1 β JNK aktivieren und darüber eine Apoptose in Betazellen auslösen (Ammendrup et al. 2000, Donath et al. 2003, Abdelli et al. 2007). TNF- α könnte also sowohl die Funktion der Betazellen negativ beeinflussen als auch eine Apoptose induzieren und wie IL-1 β eine wichtige Rolle einnehmen in den molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Diabetes mellitus führen könnten. Daher soll in dieser Arbeit auch die Wirkung von TNF- α auf die Betazellen genauer untersucht werden.

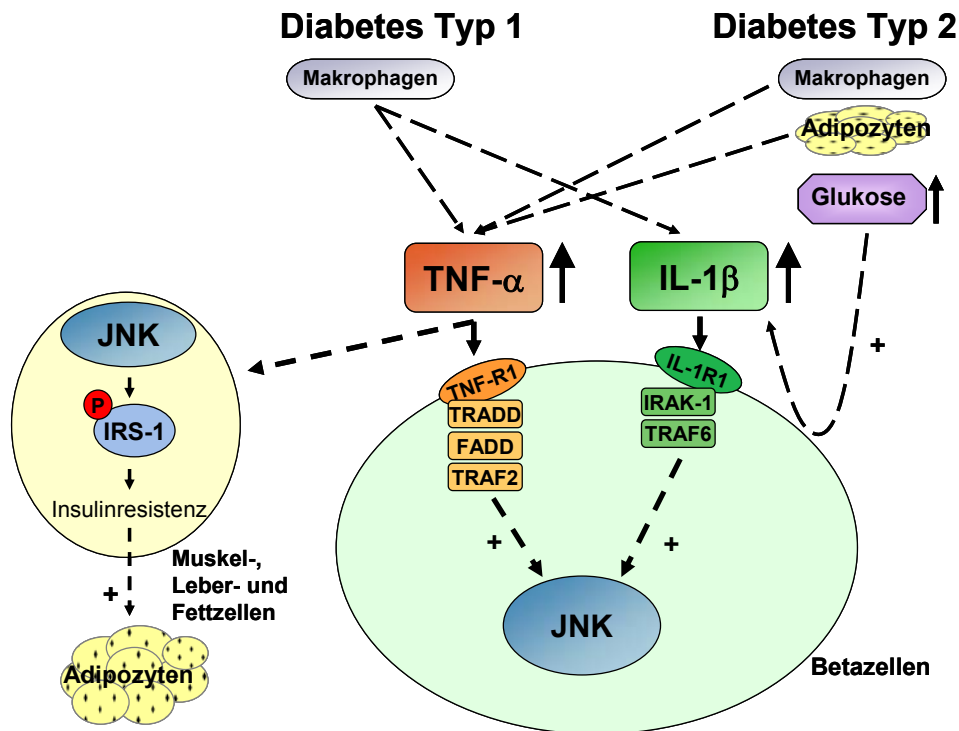


Abb. 1.7: Übersicht über die Wirkung von TNF- α und IL-1 β im Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (Zusammengefasst aus Hirosumi et al. 2002, Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003, Oetjen et al. 2007). Bei Diabetes Typ1 werden TNF- α und IL-1 β von Makrophagen in den Autoimmuninsulinitis-Läsionen freigesetzt. Bei Diabetes Typ 2 produzieren Adipozyten und Makrophagen TNF- α , erhöhte Blutglukosespiegel induzieren die Sekretion von IL-1 β aus Betazellen. TNF- α wirkt über den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und kann JNK aktivieren. In peripheren Geweben kann TNF- α über JNK das Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS-1) inhibitorisch phosphorylieren und eine Insulinresistenz vermitteln. IL-1 β wirkt über den IL-1-Rezeptor 1 (IL-1R1) und kann ebenfalls JNK aktivieren. Möglicherweise könnten TNF- α und IL-1 β die Betazellen schädigen, was in dieser Arbeit genauer untersucht werden soll.

1.8 Fragestellung

Bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 bestehen trotz unterschiedlicher Ätiologie Gemeinsamkeiten in der Pathogenese. Ein Verlust an Funktion und Masse der Betazellen führt zur klinischen Apparenz der Krankheit, der Betazelltod wird durch die Apoptose vermittelt. Auch die die Schädigung der Betazellen vermittelnden Signaltransduktionswege könnten ähnlich sein (Butler et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003, Rhodes 2005, Kahn et al. 2006). CREB ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der betazellprotektiv wirkt. CREB reguliert die Transkription des humanen Insulingens (Oetjen et al. 2003b). In Mäusen mit einer dominant-negativen CREB-Mutante kommt es zu Diabetes mellitus und zu einem Betazelltod durch Apoptose (Jhala et al. 2003). Der Einsatz des Immunsuppressivums Cyclosporin A kann zur unerwünschten Wirkung eines Posttransplantationsdiabetes führen (Penforis und Kury-Paulin 2006). CsA scheint über Hemmung von Calcineurin zu einer vermehrten Aktivität der MAP3K DLK zu führen (Mata et al. 1996, Oetjen et al. 2006, Plaumann et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass DLK die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription und den CREB-Koaktivator CBP hemmen kann (Oetjen et al. 2006, Phu et al. 2011). Die DLK induziert in Neuronen und in Betazellen eine Apoptose (Xu et al. 2001, Plaumann et al. 2008). Die Schädigung der Betazellen durch die DLK könnte auch für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 wichtig sein. Die DLK könnte einen zentralen Regulierungspunkt für betazelltoxische Substanzen wie die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ darstellen. Bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 werden vermehrt die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ produziert (Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003, Rhodes 2005). Eine Zytokinmischung führt in der Betazelllinie MIN6 zu einer Verminderung der aktiven Form von CREB, während eine Überexpression von CREB vor einer Zytokin-vermittelten Betazellapoptose schützen kann (Jambal et al. 2003). Durch $\text{TNF-}\alpha$ kann eine periphere Insulinresistenz vermittelt werden, über $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ könnte eine Betazellapoptose ausgelöst werden, dabei ist der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt (Ishizuka et al. 1999, Hirosumi et al. 2002, Mandrup-Poulsen 2003).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Wirkung die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die betazellprotektive CREB-abhängige Gentranskription und auf das Überleben pankreatischer Betazellen haben und ob diese Effekte DLK-abhängig sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden Untersuchungen mit Luciferase-Reportergen-Assays, Einsatz von siRNA gegen DLK, MTT-Vitalitätstests und Immunfluoreszenz-Assays in der Betazelllinie HIT-T15 durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Biologische und chemische Materialien

2.1.1 Chemikalien

Agarose ultrapur	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cäsiumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4',6-Diaminidino-2-Phenylindol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DEAE-Dextran	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
DMSO	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EGTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol abs.	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin (87 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycylglycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol 70 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
K ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Luciferin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
METAFACTENE™	Biontix, München, Deutschland
Methanol (100 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (Nr.2128)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumborhydrid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PEG 6.000	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapur	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Medienbestandteile und Seren

Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserum-Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Select Hefeextrakt	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Select Pepton	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Antibiotika

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

2.1.4 Enzyme

Lysozym (aus Hühnereiweiß)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Molekulargewichtsmarker und Puffer für Restriktionsenzyme

DNA-Leiter, 1kb, "Gene Ruler™"	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Y+/Tango-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Alexa Fluor 488 labeled Goat Anti-Rabbit IgG-Antibody	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti-DLK-Polyclonal-Rabbit-Antibody	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Lawrence B. Holzman, Uni- versity of Michigan, Internal Medicine/ Nephrology, Ann Arbor, MI, USA (Holzman et al. 1994)

Anti-FLAG®-M2-Monoclonal-Mouse-Antibody	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cleaved-Caspase-3(Asp175)-Rabbit-Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Tetramethylrhodamine labelled Goat Anti-Mouse-IgG-Antibody	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

2.1.7 Zytokine

Interleukin-1-beta (IL-1 β), Maus	Strathmann Biotec, Hannover, Deutschland
Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF- α), Maus	Biomol, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Cell Culture Coverslip (25mm d)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
DAPI Mounting Medium (Einbettungsmedium)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dialyseschlauch, 1/4-Diameter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einwegspritzen (5 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Filter, steril:</i> für RPMI-Medium (Porengröße 0,45 + 0,2 μ m)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kanülen (20 G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Kunststoffküvetten, 1 cm breit	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen (20 μ l-1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
Roti-Histokitt (Einbettungsmedium)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal, 10 ml)	Beckmann, München, Deutschland
<i>Zellkulturplatten:</i> 6-well-plate (siRNA-Luciferase-Assay)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

6-well-plate (Immunfluoreszenz-Assay)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
96-well-plate (GFP-Messung)	Greiner Bio-one, Solingen, Deutschland
96-well-plate (MTT-Vitalitätstest)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (Falcon 15 cm, 10 cm, 6 cm)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.2.2 Geräte und Zubehör

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav (Bioclav)	Schütt, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	IBI, New Haven, USA
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200)	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland
<i>Openlab 3.1 Imaging Software</i>	Improvision, Tübingen, Deutschland
Fluorometer (Fusion, Universal Microplate Analyser)	Packard, Dreieich, Deutschland
<i>Steuerungssoftware (Plate Reader Software Version 3.0)</i>	Packard, Dreieich, Deutschland
Gelkammer (für Agarosegele)	IBI, New Haven, USA
Inkubationsschrank (Stericult 200)	Labotect, Göttingen, Deutschland
Kunststoffkamm (1,5 mm)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Luminometer (Auto-Lumat LB 953f)	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop (invers, TMS)	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle (Whirlpool)	Philips, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Schütt, Göttingen, Deutschland
<i>Pipettierhilfen:</i>	
Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipetman P	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Plattenphotometer (UVmax kinetic microplate reader)	Molecular Devices, Menlo Park, USA
<i>Software (SOFTmax)</i>	Molecular Devices, Menlo Park, USA
Quarzküvetten, 1 cm breit	Hellma, München, Deutschland
Schüttelinkubator (Ceromat HK)	Krannich, Göttingen, Deutschland
Schüttelinkubator (Innova 4.300)	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Spektralphotometer (UV-160)	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterile Werkbank (Lamin Air HB 2448)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
<i>Tischzentrifugen:</i>	
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Transilluminator	Vetter, Wiesloch, Deutschland

(UV-Kontaktlampe CHROMA 42)	
Trockenschrank	Kindermann, Ochsenfurt/Main, Deutschland
Trockensterilisator	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultrazentrifuge (Beckmann Ultrazentrifuge L5-65)	Beckmann, München, Deutschland
Ultrazentrifugenrotor (70,1 Ti-Rotor)	Beckmann, München, Deutschland
Verschweißapparat (Beckman tube sealer)	Beckmann, München, Deutschland
Videokamera mit Videoprinter (Geldokumentationsanlage E.A.S.Y.)	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Vortexer Titramax 100	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbäder	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zellschaber (gummiert)	Greiner, Bio-one, Solingen, Deutschland
Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2-21)	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifugengefäße, 50 u. 250 ml	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifugenrotor (Beckman JA-14 Rotor)	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifugenrotor(Beckmann JA-20 Rotor)	Beckmann, München, Deutschland

2.3 Plasmide und siRNA

Alle verwendeten Plasmide enthielten ein für das Enzym β -Lactamase kodierendes Ampicillin-Resistenzgen, durch das nur die mit diesem Plasmid transfizierten Zellen auf Ampicillin enthaltendem Agar wuchsen und somit selektiert wurden.

2.3.1 Reporter-Plasmide

Reporter-Plasmide enthalten die genetische Information für einen Reporter unter der Kontrolle von Promotor- und Enhancerelementen. Durch den Reporter kann die Expression des eingesetzten Plasmids, also die erreichte Transkriptionsrate, quantitativ bestimmt werden. Die folgenden zwei Reporter wurden verwendet:

Luciferase, ein Enzym, das durch Umsetzung der Substrate Luciferin, ATP und Sauerstoff mit hohem Wirkungsgrad Licht erzeugt und ursprünglich aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* stammt. Es diente der Untersuchung der Promotoraktivierung im Luciferase-Assay (s. 2.7) (De Wet et al. 1987).

Die durch fünf Punktmutationen entstandene Mutante **GFP Topaz gold** des GFP (green fluorescent protein) aus der Qualle *Aequorea victoria* fluoresziert bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge grün. Die Mutante besitzt verbesserte Stabilität und Fluores-

zenzeigenschaften. Die Fluoreszenz kann im Fluorometer quantifiziert werden und hat den Vorteil, dass keine Substratumsetzung zum Nachweis des Gens notwendig ist. GFP Topaz gold wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz im Luciferase-Assay (s. 2.7) eingesetzt (Chalfie et al. 1994).

Folgende Reportergeren-Plasmide wurden verwendet:

Das Luciferase-Reportergeren-Plasmid **p4xSomCRET81Luc (pSomCRE)** enthält vier Kopien der CRE-Sequenz aus dem Somatostatingen-Promotor der Ratte, gekoppelt an den minimalen Promotor der Thymidin-Kinase des Herpes-Simplex-Virus. Somit können endogene CRE-bindende Proteine an das CRE-Motiv in der Promotorregion binden und die Luciferase-Expression der mit diesem Plasmid transfizierten Zellen stimulieren (Oetjen et al. 1994).

Im Plasmid **p5xGal4E1BLuc (pG5E1B)** wird die Transkription des Luciferase-Reportergerens von fünf Kopien der DNA-Bindungsstelle für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 vor einem minimalen Promotor des Adenovirus E1B kontrolliert. Ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindedomäne dieses Hefetranskriptionsfaktors Gal4 und CREB-327fl (s. 2.3.2) erlaubt so die spezifische Untersuchung der Funktion von CREB ohne Beeinflussung durch endogene CRE-bindende Proteine.

pGFPtpz-cmv (pGFP) (Packard, Cyto-GemTM, Dreieich) enthält die genetische Information für GFP Topaz gold unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors des Cytomegalievirus. Dieses Plasmid wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz im Luciferase-Assay (s. 2.7) kotransfiziert.

2.3.2 Expressionsvektoren

Expressionsvektoren enthalten unter Kontrolle eines starken und konstitutiv aktiven viralen Promotors die cDNA für ein bestimmtes Protein, welches in den mit diesem Vektor transfizierten Zellen zusätzlich oder verstärkt exprimiert werden soll.

Der Expressionsvektor **pFLAG-DLK wt (pDLKwt)** enthält die genetische Information der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK) unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Dazu wurde die 3401 bp lange cDNA der DLK in den eukaryotischen Vektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert und um die Nucleotidsequenz für ein N-terminales FLAG-Epitop ergänzt. Die DLK wurde so in den transfizierten Zellen überexprimiert und konnte durch anti-FLAG-Antikörper detektiert werden (s. 2.8) (Holzman et al. 1994).

pFLAG-DLK K185A (pDLKmut) wurde durch Einfügen einer Punktmutation in das pDLKwt-Plasmid hergestellt. Dadurch kodiert das Plasmid im Bereich der katalytischen Domäne der DLK an Position 185 (AS) für Alanin statt für Lysin. Das exprimierte Enzym kann ATP nicht mehr stabil binden und verliert somit seine katalytische Aktivität (Mata et al. 1996).

pGAL4-CREBfl (pCRG) kodiert für ein Fusionsprotein aus CREB-327 in voller Länge (full length=fl) verbunden mit der DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 (AS 1-147) (Oetjen et al. 2006). Das cDNA-Fragment für CREB-327 wurde ausgehend von dem Plasmid pRSV-CREB (Walton et al. 1992) per PCR amplifiziert und über Schnittstellen für BamHI und Sac I in das unter Kontrolle eines SV-40-Promotors stehende Plasmid pSG424 kloniert (Sadowski und Ptashne 1989).

2.3.3 Leervektoren

Zum Ausgleich der transfizierten DNA-Menge wurde der Leervektor **pBluescript (pBS)** (Stratagene, La Jolla, USA) eingesetzt. Dieser kodiert für keine relevanten genetischen Informationen und wurde sowohl im Luciferase-Assay als auch in den immunzytochemischen Experimenten verwendet.

2.3.4 siRNA

RNA-Interferenz bezeichnet einen Mechanismus eukaryotischer Zellen, die Genexpression bestimmter Gene zu beeinflussen. Wird in eine Zelle durch eine virale Infektion fremde dsDNA eingebracht, kann sie durch die endogene RNase Dicer in kleine doppelsträngige RNA-Stücke (siRNA) zerschnitten werden. Zellfremde RNA kann so abgebaut werden.

Small interference-RNA (siRNA) kann auch künstlich hergestellt werden. Sie besteht aus ca. 21-23 bp doppelsträngiger RNA, deren Basen-Sequenz homolog zu einem Abschnitt eines bestimmten Gens ist. Wird siRNA in eine Zelle eingebracht, wird sie ebenfalls von der Endonuclease Dicer erkannt und in zwei Einzelstränge geteilt. Der Antisense-siRNA-Strang zum Ziel-Gen lagert sich an einen Protein-Komplex an. Dieser Komplex heißt RNA-induced silencing complex (RISC) und kann an die zum Antisense-siRNA-Strang homologe Sequenz in der mRNA des Zielgens binden und diese degradieren.

So kann die Translation eines bestimmten Genprodukts verhindert werden und dadurch dessen Funktion untersucht werden.

Es wurde die **siRNA Nr.23** gegen die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK, Sequenz: 5'-GACUCAGACUGUGACAGCACUGAAU-3') (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und als Negativkontrolle eine unspezifische, nichtkodierende siRNA (**non-siRNA**, GC-Medium enthaltend) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Sie wurden im Luciferase-Assay (s. 2.7) eingesetzt.

Reporter- gen- Plasmid	Assay	eingesetzte Menge	Transfektionssubstanz
pSomCRE	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
	siRNA-Luciferase- Assay	1µg/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
pG5E1BLuc	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
pGFPTpz-cmv	Luciferase-Assay	0,75µg/6-cm- Schale	DEAE-Dextran
	siRNA-Luciferase- Assay	0,5µg/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
Expressionsvektor			
pDLKwt	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
	Immunfluoreszenz- Assay	2µg/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
pDLKmut(K185A)	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
	Immunfluoreszenz- Assay	2µg/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
pCRG	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
Leervektor			
pBS	Luciferase-Assay	2µg/6-cm-Schale	DEAE-Dextran
	Immunfluoreszenz- Assay	2µg/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
Reporter- gen- Plasmid	Assay	eingesetzte Menge	Transfektionssubstanz
siRNA			
siRNA Nr.23 gegen DLK	siRNA-Luciferase- Assay	60nM/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™
non-siRNA	siRNA-Luciferase- Assay	60nM/6-well-plate je Mulde	METAFACTENE™

Tab.2.1 Übersicht über eingesetzte Nukleinsäuren in den Assays

2.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

E.coli: vom Stamm DH5 α

Calciumchlorid-Lösung

CaCl ₂	50mM
gelöst in Aqua bidest., eiskalt	

LB-Medium

Select Pepton	10 g	
Select Hefeextrakt	5 g	
NaCl	10 g	
Aqua bidest.	ad 1000 ml	autoklaviert

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg	
Aqua bidest.	1 ml	sterilfiltriert

LB_{AMP}-Medium

LB-Medium	1000 ml
Ampicillin-Stammlsg.	1 ml

Chloramphenicol-Lösung

Chloramphenicol	40 mg
Ethanol abs.	1 ml

eiskalt gelöst, direkt vor Gebrauch angesetzt, 5 ml je Konstrukt

STE-Lösung

Saccharose	25 % (w/v)
Tris/HCl-Puffer (pH8,0)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

gelöst in Aqua bidest., 50 ml je Konstrukt

Lysozym-Lösung

Lysozym	60 mg
STE-Lösung	1 ml

3 ml je Konstrukt

Triton-Mix

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

gelöst in Aqua bidest., 30 ml je Konstrukt

PEG-30 %-Lösung

PEG 6.000	30 % (w/v)
NaCl	1,5 M

gelöst in Aqua bidest., 40 ml je Konstrukt

TNE-Puffer

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

gelöst in Aqua bidest., 10 ml je Konstrukt

TE-Puffer

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

gelöst in Aqua bidest., titriert auf pH 8,0, 2 x 1Liter je Konstrukt

Prinzip:

Die Maxi-Präparation (modifiziert nach Sambrook et al. 1989) wird zur Herstellung großer Mengen sehr reiner DNA gebraucht. Dazu werden E.coli-Bakterien transformiert und anschließend vervielfältigt. Im Folgenden kann die so hergestellte Plasmid-DNA durch enzymatische Lyse aus den Bakterien extrahiert und mit Hilfe eines Cäsiumchlorid-Dichtegradienten isoliert werden.

2.4.1 Sterilisation und Standards

Alle hitzestabilen Lösungen wurden vor Gebrauch bei 120°C und 1 Bar für 20 min. autoklaviert und hitzeempfindliche Lösungen gegebenenfalls sterilfiltriert, um Mikroorganismen, Proteasen und Nukleasen zu inaktivieren. Bei der Arbeit an Bakterien benutzte Glaspipetten wurden abgeflammt und alle dabei gebrauchten Arbeitsflächen und Pipettierhilfen vor und nach Benutzung mit 70-prozentigem Isopropanol gereinigt. Biologischer und chemischer Abfall wurde in geeigneter Weise entsorgt.

2.4.2 Nährboden

Um LB-Agarplatten als Nährboden für die transformierten Bakterien herzustellen, wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Select Agar in einer Konzentration von 1,5 % (w/v) zugefügt. Wenn das noch flüssige Gemisch auf ca. 55°C abgekühlt war, konnte es in 30-ml-Portionen auf 10-cm-Petrischalen (Greiner Bio-one, Solingen) verteilt werden. Bei Bedarf wurde vor dem Gießen Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt, um später darauf Ampicillin-resistente Bakterienklone zu selektieren. Nachdem sie erstarrt waren, wurden die Platten durch Inkubation für 4 h bei 37°C mit leicht geöffnetem Deckel getrocknet. Bei einer Lagerung bei 4°C waren die Platten für zwei bis drei Monate haltbar.

2.4.3 Bakterienstamm

Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurde der apathogene, keine natürliche Ampicillin-Resistenz enthaltende E.coli-Stamm DH5 α verwendet. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Bakterien mit eiskalter Calciumchlorid-Lösung behandelt. Dadurch waren sie transformationskompetent, also in der Lage, spontan Fremd-DNA aufzunehmen (Dagert und Ehrlich 1979). Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Bakterien in mit 15 % (v/v) Glycerin versetzter CaCl₂-Lösung bei -80°C gelagert.

2.4.4 Transformation kompetenter E.coli

Je Ansatz zu transformierender DNA wurden 50 μ l des transformationskompetenten Ampicillin-sensiblen E.coli-Stamms DH5 α (s. 2.4.3) in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut. Zu jedem Ansatz wurden mindestens 100 ng der gewünschten DNA (meist 1 μ l DNA-Lösung) hinzu pipettiert. Die DNA-Bakterien-Suspension wurde vorsichtig durchmischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Zur Induktion der DNA-Aufnahme in die Bakterien folgte ein Hitzeschock für maximal 2 min. bei 42°C im Wasserbad mit anschließender Abkühlung für 2-3 min. auf Eis. Nun wurde 1 ml LB-Medium je Ansatz steril hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 60 min. bei 37°C im Wasserbad, damit sich die Bakterien erholen und wieder in die Wachstumsphase übergehen konnten. Wenn danach die Trübung des Ansatzes auf ausreichendes Bakterienwachstum schließen ließ, wurden je 100 μ l mit einer abgeflamnten Pasteurpipette auf einer vorgewärmten LB_{AMP}-Agarplatte ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht.

Dabei konnten nur diejenigen Bakterien zu Kolonien heranwachsen, die das Plasmid, und damit die darauf enthaltene genetische Information für β -Lactamase aufgenommen hatten und somit Ampicillin-resistent geworden waren. Das im Nährboden enthaltene Ampicillin diente somit als adäquates Mittel zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien.

2.4.5 Herstellung von Vorkulturen und Langzeitaufbewahrung transformierter Bakterien

Von einer bewachsenen LB_{AMP}-Agarplatte wurde mit einer abgeflamnten und zur Öse gebogenen Pasteurpipette eine möglichst satellitenfreie Einzelkolonie gepickt. Diese wurde anschließend in 15 ml LB-Medium inokuliert und als Vorkultur über Nacht bei 37°C und 200 UpM im Schüttelinkubator (Innova 4.300, New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Eine Trübung des Mediums zeigte, dass die Ampicillin-resistenten, also Plasmid-tragenden Bakterien angewachsen waren.

Um jederzeit wieder auf diese Vorkultur zurückgreifen zu können, wurden 850 μ l dieser Bakterienkultur mit 150 μ l Glycerin versetzt und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

2.4.6 DNA-Großaufbereitung mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Alle Arbeitsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, auf Eis bzw. bei 4°C. Zunächst wurde je eine Vorkultur (15 ml, s. 2.4.5) zu 1000 ml LB_{AMP}-Medium gegeben und im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Um das Bakterienwachstum zu kontrollieren, wurde regelmäßig die Extinktion in 1 cm breiten Kunststoffküvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 600 nm Wellenlänge im Spektralphotometer (UV-160, Shimadzu, Duisburg) gemessen. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,8-0,9 wurde das Bakterienwachstum durch Zugabe von 5 ml Chloramphenicol-Lösung (Endkonzentration 200 mg/l) gestoppt und über Nacht wieder im Schüttler (37°C, 200 UpM) inkubiert. Chloramphenicol hemmt durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen die bakterielle Proteinbiosynthese und damit die Zellteilung, beeinträchtigt aber die DNA-Replikation nicht, so dass die DNA weiterhin angereichert wird.

Am nächsten Tag wurde jede Bakterienkultur (1000 ml) auf vier 250-ml-Zentrifugengefäße (Beckman, München) verteilt und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2-21 mit Beckman JA-14 Rotor, München) für 15 min. bei 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die vier Pellets je Konstrukt wurden in 11,25 ml eiskalter, hyperosmolarer STE-Lösung resuspendiert und paarweise in 50-ml-Zentrifugengefäßen (Beckman, München) vereinigt, so dass zwei davon je Konstrukt übrig blieben. Zu den 22,5 ml Bakteriensuspension wurden 1,5 ml Lysozym-Lösung hinzugegeben, gut gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 1,8 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) folgten wiederum 5 min. auf Eis. Nun wurde die Bakterienlyse durch Zufügen von 14,4 ml Triton-Mix vervollständigt. Es folgte eine Lagerung für 30 min. auf Eis, während der die Zentrifugengefäße alle 5 min. kräftig geschwenkt wurden. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 1 h bei 16.000 UpM und 4°C abzentrifugiert (Beckman JA-20 Rotor). Die DNA-haltigen Überstände zusammengehöriger Ansätze wurden in einem 250-ml-Zentrifugengefäß pro Konstrukt vereinigt, in dem schon 40 ml PEG-30 %-Lösung vorgelegt waren. Durch einstündige Inkubation auf Eis kam es zur Ausfällung von nukleinsäurehaltigen Präzipitaten. Nach 10 min. Zentrifugation bei 10.000 UpM und 4°C (Beckman JA-14 Rotor) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet getrocknet, bevor es sorgfältig in 10 ml TNE-Puffer resuspendiert wurde. Nun wurden, jeweils so genau wie möglich, 10,9 g Cäsiumchlorid (CsCl) und 150 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und anschließend der Inhalt jedes Zentrifugengefäßes vollständig und luftblasenfrei in ein 10-ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal, Beckman, München) überführt. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden auf der Analysenwaage auf 0,05 g genau austariert, verschweißt (Beckman tube sealer, München) und für 20 h bei 60.000 UpM und 20°C zur Bildung eines CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L5-65 mit 70,1 Ti-Rotor, Beckman, München).

Durch die Ultrazentrifugation bildet sich ein CsCl-Dichtegradient, in dem die zirkuläre, mit Ethidiumbromid gefärbte DNA je nach ihrer Dichte eine charakteristische, gut abgrenzbare Bande bildet. Diese DNA-Bande wurde mit Hilfe einer 20-G-Kanüle und einer 5-ml-Einwegspritze aus dem Ultrazentrifugenröhrchen abgezogen und in ein 15-ml-PP-Röhrchen überführt. Zur Reinigung der DNA von dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid wurde die visköse DNA-Lösung wiederholt mit äquivalenten Volumina Isoamylalkohol versetzt, vermischt und anschließend zentrifugiert (bis 3.000 UpM bei RT, Heraeus Megafuge 1.0). Die jeweils obere Phase, die nun das rötliche Ethidiumbromid in dem organischen Lösungsmittel Isoamylalkohol enthielt, wurde abgesaugt, durch neuen Isoamylalkohol ersetzt, gut gemischt und wieder zentrifugiert, bis beide Phasen farblos waren. Die DNA-haltige untere Phase wurde in einen mit Aqua bidest. vorgespülten ¼-Diameter-Dialyseschlauch (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) überführt und zur Entfernung des CsCl bei 4°C zweimal 12 h lang gegen 1L TE-Puffer pro Konstrukt dialysiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA-Lösung wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung in Transfektionsversuchen wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsenzymverdau (s. 2.4.8) und Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.4.9) validiert und die Konzentration und Reinheit der DNA im Spektralphotometer (s. 2.4.7) ermittelt.

2.4.7 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der hergestellten DNA zu bestimmen, wurde diese in geringer Menge im Verhältnis 1:50, 1:100 und 1:200 in Aqua bidest. verdünnt (20, 10 und 5 µl ad 1 ml). Die Extinktion dieser Verdünnungen wurde in 1 cm breiten Quarzküvetten bei 260 nm Wellenlänge (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, im Spektralphotometer (UV-160, Shimadzu, Duisburg) gegen Aqua bidest. gemessen.

Mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich aus der gemessenen Extinktion die DNA-Konzentration wie folgt berechnen: Die Konzentration (c) eines gelösten Stoffes ist proportional der Extinktion (E) dieser Lösung in Abhängigkeit von der Wellenlänge (λ), dem Extinktionskoeffizienten (K_λ) und der Schichtdicke (d) der benutzten Küvette ($c = E * K_\lambda * d^{-1}$). Es wurde empirisch ermittelt, dass eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm Wellenlänge und einer 1 cm breiten Küvette bei doppelsträngiger DNA einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht (Sambrook et al. 1989). So kann also die DNA-Konzentration abhängig vom Verdünnungsfaktor (V) wie folgt aus der gemessenen Extinktion berechnet werden:

$$c = OD_{260} * 0,05 * V \quad [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Idealerweise ergaben die Messungen aller drei Verdünnungen dasselbe Ergebnis.

Mögliche Verunreinigungen der DNA durch Proteine ließen sich durch Messen der Extinktion bei 280 nm Wellenlänge (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum für Proteine, überprüfen. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} gab die Reinheit der DNA an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

2.4.8 Restriktionsenzymverdau

Stopp-Mix (6-Fach konzentriert)

Glycerin	30 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v)
gelöst in Aqua bidest.	

Ein Restriktionsenzymverdau dient der Charakterisierung und Überprüfung von Plasmid-DNA. Doppelsträngige DNA wird durch Restriktionsendonukleasen an meist palindromisch aufgebauten Erkennungssequenzen gespalten und dadurch linearisiert. Die Gesamtgröße des Plasmids kann in einer anschließenden horizontalen Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Bei mindestens zwei geschickt ausgesuchten Schnittstellen entstehen so für das jeweilige Plasmid typische Bruchstücke. Der Restriktionsenzymverdau gibt auch einen Hinweis auf die Güte der DNA, da die Effizienz der Restriktionsendonukleasen unter anderem von der Reinheit der DNA abhängig ist (Sambrook et al. 1989).

Beim Restriktionsenzymverdau wurde 1 µg DNA mit je 2 Einheiten eines oder zweier Restriktionsenzyme in den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen vermischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes ergab 10 µl, dabei durfte das Volumen der Enzymlösungen nicht mehr als 10 % davon betragen. Die Ansätze wurden für 2 h im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des 6-Fach konzentrierten Stopp-Mixes (1/6 des Endvolumens) zum Inaktivieren der Restriktionsenzyme sowie Farbstoffe hinzugegeben. In der folgenden Agarosegelelektrophorese wurden die Fragmente der neu hergestellten DNA mit denen des Ausgangsplasmids und einer Negativ-Kontrolle mit Hilfe des Größenstandards eines Molekulargewichtmarkers, verglichen.

2.4.9 Horizontale Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer

Tris/HCl (pH 8,0)	2 M
Eisessig	1 M
EDTA (pH 8,0)	50 mM

In horizontalen Agarosegelen lassen sich DNA-Moleküle von 100 bis 50.000 bp Größe auftrennen, denn die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern durch Anlegen eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Gesamtzahl der Basenpaare und der Sekundärstruktur ab. Durch den Farbstoff Ethidiumbromid, der mit doppelsträngiger DNA interkalierende Komplexe bildet und bei Anregung mit kurzwelligem UV-Licht leuchtet, können die verschieden großen DNA-Fragmente in dem Gel sichtbar gemacht werden (Sambrook et al. 1989).

Es wurde ein Gel mit 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer passend zur Größe der erwarteten DNA-Fragmente eingesetzt. Dazu wurde TAE-Stammlösung 1:50 verdünnt, im Erlenmeyerkolben mit 1 % Agarose ultrapur versetzt und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C kam eine entsprechende Menge Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) hinzu und das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer mit einem Kunststoffkamm (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) zur Erzeugung der gewünschten Geltaschen gegossen. Nach Abkühlung und Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig gezogen, das Gel aus der Kammer gelöst und in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Nun wurden die mit dem Stopp-Mix versetzten Restriktionsenzymverdau-Ansätze (s. 2.4.8) vollständig in die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Größenmarker wurde eine 1 kb DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), die in der Elektrophorese 14 Banden von 250 bis 10.000 bp Länge anzeigt, in eine weitere Tasche gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte anfangs bei einer Spannung von 40 V und später 100 V, bis die farbige Lauffront das gegenüberliegende Gel-Ende fast erreicht hatte.

Die so aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mit einem Transilluminator (Vetter, Wiesloch) bei 254 nm Wellenlänge als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und mit einer Videokamera samt angeschlossenen Videoprinter (Herolab, Wiesloch) dokumentiert werden.

2.5 Standardtechniken für das Arbeiten mit Zellkulturen

2.5.1 Zelllinie HIT-T15

Die Untersuchungen wurden in der permanenten Zelllinie HIT-T15 durchgeführt. Sie entstand, indem pankreatische Betazellen des Syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) mit dem Simian-Virus 40 transformiert wurden. HIT-T15-Zellen besitzen wichtige Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes: Phänotypisch neigen HIT-T15-Zellen in Kultur dazu, aneinanderhaftende, inselähnliche Multilayer zu bilden. Sie können Proinsulin und Insulin produzieren und besitzen sekretorische Granula (Santerre et al. 1981).

HIT-T15-Zellen sind wie Neuronen elektrisch erregbar, so dass eine Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger, Dihydropyridin-sensitiver L-Typ-Calciumkanäle führt. Hierdurch steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration an und Insulin wird freigesetzt (Keahey et al. 1989).

Außerdem ist die Aktivierbarkeit dieser Zellen durch den second messenger cAMP ausführlich beschrieben (Schwaninger et al 1993a, b, c, 1995a, b, Oetjen et al. 1994, 2003b, 2005, 2006).

2.5.2 Puffer und Nährmedien

RPMI 1640-Medium

RPMI 1640-Pulver	10 g
NaHCO ₃	2 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Komplett-Medium (Kulturmedium)

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

10 x PBS (Phosphate-Buffered Saline)-Puffer

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der PBS-Puffer wurde mit NaOH auf einen pH von 7,4 titriert und anschließend autoklaviert. Für die Benutzung in der Zellkultur wurde dieser Puffer 1:10 in Aqua bidest. verdünnt (1 x PBS). Beide Puffer wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Das RPMI-Medium wurde nach der Herstellung sterilfiltriert. Die Seren und Antibiotika wurden unter sterilen Bedingungen hinzugefügt und alle Medien bei 4°C aufbewahrt.

2.5.3 Standardbedingungen und Zellkultivierung

Der Umgang mit den HIT-T15-Zellen erfolgte unter sterilen Arbeitsbedingungen. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder, wenn sie hitzeempfindlich waren, sterilfiltriert. Alle Arbeitsschritte mit der Zellkultur waren bei Laminarluft unter einer sterilen Werkbank (Labotect, Göttingen) durchzuführen. Vor dem Arbeiten unter der sterilen Werkbank wurde eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt und alle auch außerhalb der Werkbank benutzten oder gelagerten Geräte und Materialien wurden von außen mit 70-prozentigem Isopropanol abgewischt. Glaspipetten und -flaschen waren vor Gebrauch unter der Sterilbank zusätzlich abzuflammen.

Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Mit den Zellkulturen in Berührung gekommene Lösungen und Materialien wurden gesondert entsorgt. Die HIT-T15-Zellkultivierung erfolgte im Inkubationsschrank (Stericult 200, Labotect, Göttingen) bei 37°C in 95 % Luftfeuchtigkeit unter 5 % CO₂-Begasung.

Für die Kultivierung und Passagierung der Zellen wurden Zellkulturschalen mit 15 cm Durchmesser (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet (s. Tab.2.2). Gesunde HIT-T15-Zellen wuchsen darauf adhärent erst in Mono- und am 5. bis 6. Tag auch in Multilayern. Wachstum und Phänotyp der Zellen waren regelmäßig unter einem inversen Mikroskop (Nikon TMS, Düsseldorf) zu beurteilen. Als HIT-T15-Kulturmedium wurden je 15-cm-Schale 30 ml Komplett-Medium (s. 2.5.2) verwendet. Am 3. oder 4. Tag des Zellwachstums erfolgte damit ein Mediumwechsel (s. 2.5.5).

Bedingt durch Wachstumsgeschwindigkeit und Aufteilungsverhältnis waren die HIT-T15-Zellen auf 15-cm-Schalen nach ca. einer Woche mit einer Zellzahl von etwa 3×10^7 konfluent bewachsen. Diese Zellen wurden entweder im Verhältnis 1:4 gesplittet (s. 2.5.4), also zur Kultur auf neue 15-cm-Schalen ausplattiert, oder für das jeweilige Experiment auf verschiedene andere Zellkulturschalen ausplattiert (s. 2.5.7 und s. Tab.2.2). Nach einer Veränderung der Umweltbedingungen durch Mediumwechsel oder Splitten der Zellen war für mindestens 24 Stunden jede weitere Manipulation zu vermeiden. Die für die jeweiligen Experimente ausplattierten Zellen konnten jedoch nach der METAFECTENETM-Methode oder der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (s. 2.5.8) bzw. mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9).

2.5.4 Splitten der HIT-T15-Zellen

Die nach ca. einer Woche konfluent bewachsenen 15-cm-Schalen wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet, d.h. die Zellen einer 15-cm-Schale wurden gleichmäßig auf vier neue 15-cm-Schalen aufgeteilt. Die Gesamtanzahl der Splitvorgänge bestimmte dabei die Passagezahl, sozusagen das „Alter“ der Zellen. Es wurden Zellen der Passagen 35 - 70 eingesetzt, was einer relativen frühen Passagezahl entspricht.

Zuerst wurde das alte Kulturmedium vorsichtig vom Rand der Schale her abgesaugt. Dann wurden die adhärennten, also gesunden Zellen durch Zugabe von 10 ml PBS-Puffer, der durch leichtes Schwenken verteilt und dann wieder abgesaugt wurde, von abgestorbenen Zellen und Mediumresten befreit. Um die Zellen von der Schale abzulösen wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung gleichmäßig auf den Zellen verteilt, diese für 5 Minuten bei 37°C in den Inkubationsschrank gestellt und anschließend die Schale vorsichtig manuell beklopft. Zugabe von 10 ml Kulturmedium stoppte die Trypsinwirkung ab. Durch mehrmaliges Spülen mit einer Glaspipette konnten die noch an der Schale anhaftenden Zellen vom Kulturschalenboden abgelöst werden. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 50-ml-PP-Röhrchen (Greiner Bio-one, Solingen) überführt und bei 1300 UpM und RT für zwei Minuten zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet erneut in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension zentrifugiert (1300 UpM, RT, 2 min.). Der Überstand wurde wiederum abgesaugt, um verbliebenes Trypsin/EDTA herauszuwaschen.

Nun konnten die Zellen entweder gesplittet oder für das jeweilige Experiment ausplattiert werden.

Um die Zellen im Verhältnis von 1:4 zu splitten, wurde das Zellpellet in 20 ml Kulturmedium aufgenommen. Je ein Viertel dieser Zellsuspension (also 5 ml) wurden gleichmäßig auf eine neue 15-cm-Schale mit schon 25 ml vorgelegtem Kulturmedium verteilt. Dabei musste die Zellsuspension vor jedem Pipettierschritt gut resuspendiert werden, um gleichmäßige Zellmengen in jedem Aliquot zu gewährleisten. Die Aufbewahrung erfolgte im Inkubationsschrank.

2.5.5 Mediumwechsel

Das Kulturmedium auf jeder 15-cm-Schale musste am 3. oder 4. Tag des Zellwachstums gewechselt werden. Dazu wurde das verbrauchte Medium vorsichtig vom Rand der Kulturschale abgesaugt und durch 30 ml frisches, vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt.

2.5.6 Langzeitaufbewahrung, Gefrierkonservierung und Revitalisierung von HIT-T15-Zellen

Um sicherzustellen, dass immer ein Vorrat gesunder HIT-T15-Zellen mit ähnlicher Passagzahl wie die für die Experimente verwendeten Zellen zur Verfügung stand, erfolgte die Langzeitaufbewahrung von einem Teil dieser Zellen in mit 10 % (v/v) DMSO versetztem Komplettmedium in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C .

Zur Langzeitaufbewahrung ließen sich aus den Zellen einer vollständig bewachsenen 15-cm-Schale 2 - 3 Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) mit je 1,5 ml Zellsuspension herstellen. Dazu wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 15-cm-Schale entsprechend der Vorgehensweise beim Splitten (s. 2.5.4) erst einmal mit PBS gewaschen, dann mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in ein 50-ml-PP-Röhrchen überführt und ein- bis zweimal mit 10 ml Komplett-Medium gewaschen.

Die Zellen wurden in 1,35 ml Komplettmedium und 150 μl DMSO pro Einfrierröhrchen aufgenommen und vorsichtig resuspendiert, so dass DMSO 10 % des Volumens ausmachte. Dies war notwendig, weil DMSO die Zellen vor der Ausbildung von Eiskristallen beim Einfrieren und damit vor Zerstörung schützt. Je 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in jedes Einfrierröhrchen gegeben. Zum kontrollierten Einfrieren wurden die Zellen sofort für 1-2 h auf Eis und anschließend für zwei bis vier Wochen bei -80°C gelagert. Erst dann konnten die Zellen zur Langzeitaufbewahrung in den Stickstofftank überführt werden.

Die HIT-T15-Zellen konnten nun nach Bedarf zur erneuten Verwendung revitalisiert werden. Weil DMSO bei Erwärmung über 10°C toxisch wirkt, mussten die Zellen zügig im 37°C -Wasserbad aufgetaut werden, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in ein mit 15 ml vorgewärmtem Komplett-Medium gefülltes 50-ml-PP-Röhrchen überführt. Nach 2 min. Zentrifugation mit 1300 UpM bei RT wurden DMSO-Reste durch Waschen mit 15 ml Komplett-Medium und erneute Zentrifugation entfernt. Dann wurde das Zellpellet in 10 ml Komplett-Medium aufgenommen und auf einer Zellkulturschale ausplattiert. Die HIT-T15-Zellen konnten nun wie gewohnt kultiviert (s. 2.5.3) und gesplittet (s. 2.5.4) und nach 2 - 3 Wochen auch transfiziert (s. 2.5.8) werden. Ein Teil dieser HIT-T15-Zellen wurde nach kurzer Passagezeit wie oben beschrieben wieder zur Langzeitaufbewahrung gefrierkonserviert.

2.5.7 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für das jeweilige Experiment

Im Folgenden ist das Ausplattieren, also die Verteilung der HIT-T15-Zellen auf die jeweiligen Zellkulturschalen für die verwendeten Methoden, einzeln aufgeführt.

Zellkulturschale	Menge an Kulturmedium	Zellanzahl	Verwendungszweck
15-cm-Schale	30 ml	ca. $3-5 \times 10^7$	Kultivierung und Splitten
6-cm-Schale	5 ml	ca. $2-5 \times 10^6$	Luciferase-Assay mit DEAE-Dextran Transfektion
6-well-plate mit Cell-Culture Coverslip	2 ml/Mulde	ca. 1×10^6 /Mulde	Immunfluoreszenz-Assay mit METAFECTENE™-Transfektion
6-well-plate mit adhärentem Zellwachstum	2 ml/Mulde	ca. $0,5 \times 10^6$ /Mulde	siRNA-Luciferase-Assay mit METAFECTENE™-Transfektion
96-well-plate	100 µl/Mulde	ca. 1×10^4 /Mulde	MTT-Vitalitätstest

Tab.2.2: Darstellung aller verwendeten Zellkulturschalen

2.5.7.1 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den MTT-Vitalitätstest

Für den MTT-Vitalitätstest mussten die HIT-T15-Zellen auf eine 96-well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) ausplattiert werden. Dazu erfolgten alle Arbeitsschritte wie beim Splitten (s. 2.5.4). Zum Schluss wurde ein Teil der Zellsuspension in Komplett-Medium (s. 2.5.2) so verdünnt, dass eine Konzentration von 1×10^4 Zellen/100 µl vorlag. Unter wiederholtem Resuspendieren, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten, wurden je 100 µl dieser Zellsuspension auf je eine Mulde der 96-well-Platte gegeben. Dabei wurden die jeweils am Rand gelegenen Mulden nur mit Komplett-Medium befüllt, weil dort eine größere Verdunstungsgefahr bestand als in den weiter innen liegenden Mulden. Diese nur mit Komplett-Medium befüllten Kavitäten dienten gleichzeitig als Leerwert. Nach 48 h Inkubation bei 37°C sollten ungefähr $2-4 \times 10^4$ Zellen in jeder Mulde vorhanden sein. Während dieser Zeitspanne, frühestens jedoch nach 2 h, konnten die Zellen nach Bedarf mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9). Anschließend wurden sie geerntet (s. 2.6 MTT-Test).

2.5.7.2 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden die verwendeten Plasmide durch Transfektion mit DEAE-Dextran in die HIT-T15-Zellen eingebracht. Die DEAE-Dextran-Transfektion erfolgte im selben Arbeitsschritt wie das Ausplattieren, deshalb werden beide Vorgänge gemeinsam unter Punkt 2.5.8.2 beschrieben.

2.5.7.3 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den siRNA-Luciferase-Assay

Für den siRNA-Luciferase-Assay wurden 6-well-Platten (Nunc, Wiesbaden) ohne Deckgläschen benutzt, so dass die HIT-T15-Zellen direkt adhärent anwuchsen. Es wurde aus einer konfluent bewachsenen 15-cm-Platte wie beim Splitten (s. 2.5.4) eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde in soviel Komplettmedium aufgenommen, dass eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6 / 2$ ml/Mulde resultierte. Die Aufbewahrung erfolgte im 37°C-Inkubator. Die Zellen konnten nun mit Hilfe von METAFECTENETM mit siRNA und Plasmiden transfiziert (s. 2.5.8.1) und mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9). Das weitere Vorgehen siehe Luciferase-Assay mit siRNA (s. 2.7).

2.5.7.4 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für den Immunfluoreszenz-Assay

Für den Immunfluoreszenz-Assay wurden 6-well-Platten, in die speziell für die Zellkultur beschichtete runde Deckgläschen (Nunc, Wiesbaden) gelegt wurden, benutzt. Diese Deckgläschen konnten später auf Objektträgern fixiert und mikroskopisch ausgewertet werden.

Eine konfluent mit HIT-T15-Zellen bewachsene 15-cm-Zellkulturschale (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurde analog dem Vorgehen beim Splitten (s. 2.5.4) verarbeitet. Die Zellen wurden so in Komplett-Medium verdünnt, dass eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/2 ml resultierte. Von dieser Verdünnung wurden dann je 2 ml pro Mulde vorsichtig auf die Deckgläschen getropft.

Die 6-well-Platten wurden anschließend im 37°C-Inkubator aufbewahrt und konnten für den Immunfluoreszenz-Assay mit METAFECTENETM transfiziert (s. 2.5.8.1) und mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9). Nun konnten die Zellen mit Antikörpern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden (s. 2.8).

2.5.8 Transfektion von Plasmid-DNA bzw. siRNA

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen. Man unterscheidet zwischen transienter Transfektion, bei der die Plasmid-DNA nicht in das Wirts-Genom eingebaut und daher nach wenigen Tagen wieder degradiert wird und stabiler Transfektion, bei der die DNA dauerhaft ins Genom der Wirtszelle integriert wird. Es wurden die Transfektion nach der METAFECTENETM-Methode und nach der DEAE-Dextran-Methode durchgeführt, beides sind transiente Transfektionen.

Es konnten die oben (s. 2.3) beschriebenen Plasmide und Expressionsvektoren transfiziert werden. Zusätzlich wurde in einigen Experimenten auch siRNA (s. 2.3.4) mit Hilfe der METAFECTENETM-Methode transfiziert.

2.5.8.1 Transfektion nach der METAFECTENE™-Methode

Lösungen und Reagenzien:

Plasmid-DNA: pDLKwt, pDLKmut, pBS, pGFP, pSomCRE (s. 2.3)

Interferenz-RNA: siRNA Nr.23, non-siRNA (s. 2.3.4)

Transfektionsreagenz: METAFECTENE™ (Biontex, München)

RPMI 1640-Medium (s. 2.5.2): Serum- und Antibiotika-frei

Prinzip:

Die METAFECTENE™-Methode (modifiziert nach Angaben des Herstellers) ist eine transiente Transfektion. METAFECTENE™ ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, das in Form von positiv geladenen Liposomen die negativ geladene DNA oder RNA als Komplex (sog. Lipoplexe) bindet. Die Aufnahme dieses Komplexes in die Zelle erfolgt durch Endozytose. Durch Ruptur der endosomalen Membran auf Grund eines relativ hohen osmotischen Gradienten wird das genetische Material in der Zelle freigesetzt und kann bei der nächsten Mitose, wenn die Kernmembran aufgelöst wird, in den Zellkern gelangen.

In HIT-T15-Zellen ließ sich mit dieser Methode eine Transfektionseffizienz von ca. 15 % erreichen.

Durchführung:

METAFECTENE™ wurde als Transfektionsreagenz im Immunfluoreszenz-Assay und im siRNA-Luciferase-Assay eingesetzt.

Für den **Immunfluoreszenz-Assay** wurden die HIT-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/Mulde ausplattiert (s. 2.5.7.4). Die Transfektion hatte innerhalb der ersten Stunde nach dem Ausplattieren zu erfolgen. So lange wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Der Transfektionskomplex aus DNA und METAFECTENE™ wurde in einem sterilen 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt. Dazu wurden von der zu transfizierenden Plasmid-DNA (je nach Experiment pDLKwt, pDLKmut, pBS) 2 µg/Mulde vorgelegt, mit Serum- und Antibiotika-freiem RPMI1640-Medium auf 100 µl/Mulde aufgefüllt und sorgfältig durchmischt. Die RPMI 1640-Lösung wurde immer zuerst in die Gefäße gegeben, um die Adhäsion der eingesetzten Reagenzien an die Plastikwand zu minimieren. In ein zweites 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 2 µl METAFECTENE™/µg DNA gegeben und ebenfalls mit RPMI 1640-Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 µl/Ansatz aufgefüllt und durchmischt. Dies entspricht einem Verhältnis von DNA (µg) zu METAFECTENE™ (µl) von 1 : 2. Beide Ansätze wurden vereinigt, wieder durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und anschließend 15 min. bei 37°C inkubiert. Nun konnten jeweils 200 µl des fertigen Transfektionskomplexes pro Mulde auf die ausplattierten Zellen gegeben werden.

Für den **siRNA-Luciferase-Assay** wurden die HIT-T15-Zellen mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/Mulde in 6-well-Platten ausplattiert (s. 2.5.7.3). Wie oben beschrieben er-

folgte innerhalb von einer Stunde danach das Ansetzen und Auftragen des Transfektionskomplexes. Für den Nukleinsäuren-Ansatz wurde an Plasmid-DNA 1 µg/Mulde pSomCRE und 0,5 µg/Mulde pGFP sowie 60 nM siRNA Nr.23 (bzw. 60 nM non-siRNA) eingesetzt, mit RPMI1640-Medium auf 100 µl/Ansatz aufgefüllt und durchmischt. Für den Transfektionsreagenz-Ansatz wurden für die DNA 3 µl METAFECTENE™ und für die siRNA 3,9 µl METAFECTENE™ eingesetzt, mit RPMI1640-Medium auf 100 µl/Ansatz aufgefüllt und durchmischt. Das entspricht einem Verhältnis von DNA zu METAFECTENE™ von 1 : 2 und einem Verhältnis von siRNA zu METAFECTENE™ von 1 : 0,65. Wie oben beschrieben wurden beide Ansätze vereinigt, für 15 min. bei 37°C inkubiert und je 200 µl/Mulde auf die Zellen aufgetragen.

Eine Behandlung mit Reagenzien (s. 2.5.9) erfolgte frühestens 2 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden je nach Versuch bis zu 72 h, in der Regel für 48 h im Inkubator belassen und somit der Transfektionslösung ausgesetzt.

2.5.8.2 Transfektion nach der DEAE-Dextran-Methode

Lösungen und Reagenzien:

Plasmid-DNA: pSomCRE, pCRG, pG5E1B, pGFP, pDLKmut, pBS

Inkomplettes Medium

Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
in RPMI 1640-Medium (s. 2.5.2)	

TD-Puffer

Tris/HCl (pH7,4)	25 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
K ₂ HPO ₄	0,7 mM
gelöst in Aqua bidest. und autoklaviert	

DEAE-Dextran-Lösung

DEAE-Dextran	60 mg
Aqua bidest.	1 ml
sterilfiltriert, bei 4°C aufbewahrt	

Komplett-Medium (s. 2.5.2)

1 x PBS (s. 2.5.2)

Prinzip:

Die Transfektion mit DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) ist ebenfalls eine transiente Transfektion. Sie ist die älteste Transfektion mittels kationischer Polymere. DEAE-Dextran ist ein kationisches Kohlenhydratpolymer, das auf Grund seiner positiven Ladung mit der negativ geladenen DNA einen Komplex bilden kann. Dadurch ist die DNA vor Nucleasen geschützt. Der DNA-Dextran-Komplex kann sich an die Zellmembran anlagern, wird höchstwahrscheinlich per Endozytose in die Zelle aufgenommen und in den Zellkern transportiert.

Ungefähr 4-6 % der eingesetzten HIT-T15-Zellen nahmen die Plasmid-DNA auf. Die Dextran-Methode eignet sich allerdings nur für transiente Transfektionen (Sambrook et al. 1989).

Durchführung:

DEAE-Dextran wurde als Transfektionsreagenz für den Großteil der Reporter-Gen-Assays eingesetzt. Dabei erfolgten das Ausplattieren und die Transfektion im selben Arbeitsablauf.

Die zu transfizierende DNA und das Transfektionsreagenz wurden in je einem sterilen 50-ml-PP-Röhrchen vorgelegt. Das erste 50-ml-PP-Röhrchen enthielt 5 µl/6-cm-Schale DEAE-Dextran-Lösung für die gesamte Transfektion mit 0,75 µg/Schale des Plasmids pGFP als Kontrolle der Transfektionseffizienz. In weiteren 50-ml-PP-Röhrchen wurden je 2 µg/6-cm-Schale der gewünschten Plasmid-DNA getrennt nach Transfektionsgruppen (je nach Fragestellung pSomCRE, pCRG, pG5E1B, pDLKmut oder pBS) vorgelegt.

Nun konnten die HIT-T15-Zellen vorbereitet werden. Aus einer konfluent mit HIT-T15-Zellen bewachsenen 15-cm-Zellkulturschale ließen sich ca. 12 6-cm-Schalen für den Luciferase-Assay ausplattieren. Aus diesem Verhältnis resultierte eine Zelldichte von ca. $2 \cdot 5 \cdot 10^6$ Zellen je 6-cm-Schale (s. Tab.2.2).

Wie beim Splitten (s. 2.5.4) wurde von der 15-cm-Schale zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt und Mediumreste und abgestorbene Zellen durch Waschen mit 10 ml 1xPBS entfernt. Durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung und fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurden die vitalen Zellen enzymatisch und durch anschließendes Beklopfen der Schale zusätzlich auch mechanisch von der Schale gelöst. Abweichend vom Protokoll beim Splitten konnten noch anhaftende Zellen nun durch wiederholtes Spülen mit 20 ml inkomplettem Medium gelöst und in ein 50-ml-PP-Röhrchen überführt werden. Es folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 1300 UpM und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zur Entfernung der Trypsin/EDTA-Lösung in 15 ml TD-Puffer resuspendiert, unter gleichen Bedingungen wieder zentrifugiert und abgesaugt. Das Zellpellet konnte nun in das gewünschte Volumen TD-Puffer aufgenommen werden,

wobei je 1 ml pro eingesetzter 6-cm-Schale gerechnet und diesem Volumen noch 1 ml als Reserve zugesetzt wurde.

Die in TD-Puffer resuspendierten Zellen wurden in das erste 50-ml-PP-Röhrchen, welches das vorgelegte DEAE-Dextran und pGFP enthielt, überführt und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde diese Zellsuspension auf die getrennt nach Transfektionsgruppen in 50-ml-PP-Röhrchen vorgelegte Plasmid-DNA aufgeteilt. Dabei wurde 1 ml pro 6-cm-Schale gerechnet. Jedes Röhrchen wurde vorsichtig geschwenkt, um die Komplexe aus DNA und DEAE-Dextran gleichmäßig auf die HIT-T15-Zellsuspension zu verteilen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Durch Zugabe von so viel ml Komplett-Medium, wie der jeweilige Transfektionsansatz an Volumen bereits enthielt, wurde die Transfektion abgestoppt. Jeder Transfektionsansatz wurde zentrifugiert (2 min./1300 UpM/RT), jedes Zellpellet einzeln durch Absaugen vom Überstand befreit und mit 10 ml Komplett-Medium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Zum Schluss wurde jedes Zellpellet in das zum Ausplattieren gewünschte Volumen Komplett-Medium aufgenommen (1,5 ml/6-cm-Schale). Auf jede 6-cm-Schale wurden 3,5 ml vorgewärmtes Komplett-Medium vorgelegt. Dann wurden 1,5 ml der Zellsuspension pro Schale vorsichtig aufgeträufelt. Die so ausplattierten Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls konnten die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9).

2.5.9 Behandlung der HIT-T15-Zellen mit Reagenzien

Lösungen und Reagenzien:

CsA-Stammlösung (830 µM)

CsA	1 mg
Ethanol	0,1 ml
Tween 80	20 ml
RPMI 1640-Medium	ad 1 ml
sterilfiltriert und aufbewahrt bei -20°C	

TNF-α-Stammlösung (0,1 µg/µl)

TNF-α	10 µg
Aqua bidest.	100 µl
aliquotiert und aufbewahrt bei -20°C	

IL-1β-Stammlösung (0,1 µg/µl)

IL-1β	10 µg
Aqua bidest.	100 µl
aliquotiert und aufbewahrt bei -20°C	

KCl-Lösung (2M)

KCl	4,97 g
Aqua bidest.	ad 40 ml

sterilfiltriert und aufbewahrt bei 4°C

Forskolin-Lösung

Forskolin	1 mg
DMSO	243,6 µl

aufbewahrt bei -20°C

Prinzip:

Je nach Fragestellung des Experiments wurden die HIT-T15-Zellen gegebenenfalls mit Reagenzien zu den gewünschten Zeitpunkten vor der Ernte behandelt. Dabei wurden Phänotyp und Zelldichte regelmäßig unter dem inversen Mikroskop beurteilt.

Es wurde Aqua bidest. als Lösungsmittel eingesetzt. Nur das Reagenz Forskolin wurde in DMSO gelöst. Dabei durfte das DMSO-Volumen nicht mehr als 0,1 % des Gesamtvolumens betragen. Um einen eventuellen Fehler durch das Lösungsmittel DMSO auszugleichen, wurden alle Zellen, die nicht das in DMSO gelöste Reagenz erhielten, mit dem gleichen Volumen reinen DMSOs zum selben Zeitpunkt behandelt.

Es wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

Cyclosporin A (CsA):

CsA ist ein Immunsuppressivum, dessen wichtigstes Einsatzgebiet die Verhinderung von Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin ist. Eine Nebenwirkung von CsA ist das Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes mellitus (Matsuda und Koyasu 2000, Chadban 2008).

Interleukin-1Beta (IL-1β):

IL-1β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das pankreatische Betazellen schädigen kann. Es wird bei erhöhten Blutglukosespiegeln vermehrt in Betazellen produziert (Maedler et al. 2002).

Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF-α):

TNF-α ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin. Es wird bei Übergewicht und Hyperinsulinämie vermehrt im Fettgewebe produziert und ist eng mit dem Entstehen von Insulinresistenz assoziiert (Hotamisligil et al. 1995). Im MTT-Vitalitätstest, im Luciferase-Assay mit und ohne siRNA von DLK und in der Immunfluoreszenz wurden HIT-T15-Zellen mit TNF-α und IL-1β stimuliert (s. Tab.2.3).

Kaliumchlorid (KCl):

Durch eine Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration von 5 mM auf 45 mM kommt es zu einer Membrandepolarisation. Diese führt zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle, so dass die intrazelluläre Calciumkonzentration für einige Minuten auf das

Zwei- bis Dreifache ansteigt. Dies konnte auch an den elektrisch erregbaren HIT-T15-Zellen, die spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle besitzen, gezeigt werden (Thomas und Pek 1992, Schwaninger et al. 1993c).

Forskolin (FSK):

Forskolin aktiviert die Adenylatcyclase, so dass es zu einem Anstieg des second messengers cAMP in der Zelle kommt (Seamon et al. 1981). KCl und Forskolin wurden im Reporter-gen-Assay mit und ohne siRNA gegen DLK eingesetzt. Dabei wurden die HIT-T15-Zellen 6 h vor der Ernte mit beiden Reagenzien stimuliert.

Assay	verwendete Reagenzien	eingesetzte Konzentrationen	Inkubationszeiten
MTT-Vitalitätstest	TNF- α	30 ng/ml	0; 6; 12; 24; 48 h
		0; 3; 30; 300; 3000 ng/ml	48 h
	IL-1 β	10 ng/ml	0; 6; 12; 24; 48 h
		0; 0,3; 3; 30; 300 ng/ml	48 h
Luciferase-Assay	TNF- α	30 ng/ml	24 h
		0; 1; 10; 100; 300; 1000 ng/ml	24 h
	IL-1 β	0; 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml	24 h
	KCl	40 mM	6 h
	Forskolin	10 μ M	6 h
Immunfluoreszenz-Assay	CsA	30, 300 nM	48 h
	TNF- α	30 ng/ml	0; 6; 12; 24; 48 h
		0; 1; 10; 100; 300; 1000 ng/ml	48 h
Assay	verwendete Reagenzien	eingesetzte Konzentrationen	Inkubationszeiten
	IL-1 β	10 ng/ml	0; 6; 12; 24; 48 h
		0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 ng/ml	48 h
siRNA-Luciferase-Assay	TNF- α	10 ng/ml	24 h
	IL-1 β	10 ng/ml	24 h
	KCl	40 mM	6 h
	Forskolin	10 μ M	6 h

Tab. 2.3: Übersicht über den Einsatz von Reagenzien in den Assays

2.6 MTT-Vitalitätstest

Lösungen und Reagenzien:

MTT-Reagenz

MTT	5 mg
1xPBS	1 ml
sterilfiltriert, aliquotiert aufbewahrt bei -20°C	

SDS-Lösung (20 %SDS in 0,02 N HCl)

SDS	20 g
= Natriumdodecylsulfat	
HCl 1N	2 ml
Aqua bidest.	98 ml
aufbewahrt bei Raumtemperatur	

Prinzip:

Der MTT-Test bestimmt die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen als Maß für die Vitalität von Zellen. Das 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) besitzt eine gelbe Farbe. Es kann nur von lebenden Zellen umgesetzt werden, denn es dringt in die Zellen ein und wird durch die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien gespalten. Dabei entsteht das dunkelblaue, alkohollösliche Formazan. Durch das Detergenz SDS werden die Zellen lysiert und das Formazan freigesetzt. Je dunkler das Blau, desto mehr vitale Zellen waren vorhanden. Die Intensität des dunkelblauen Formazans kann bei 550 nm photometrisch bestimmt werden (Mosmann 1983, Berridge und Tan 1993).

Durchführung:

Die HIT-T15-Zellen wurden so in eine 96-well-Platte ausplattiert, dass eine Zelldichte von 1×10^4 /Mulde resultierte (s. 2.5.7.1). Nach 2 h konnten die Zellen mit Reagenzien behandelt werden. Es wurden Konzentrationswirkungskurven und Zeitwirkungskurven mit IL-1 β und TNF- α durchgeführt (s. 2.5.9). Nach 48 h konnten die Zellen geerntet werden. Dazu wurden in jede Mulde zu den 100 μ l Medium 10 μ l MTT-Reagenz unter sterilen Bedingungen hinzu pipettiert, was eine Endkonzentration von 0,45 μ g/ μ l ergab. Es folgte eine zwei-stündige Inkubation bei 37°C. Während dieser Zeit wurde das gelbe MTT durch die mitochondrialen Dehydrogenasen in blaues Formazan gespalten. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter nicht sterilen Bedingungen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Es wurden 100 μ l SDS-Lösung in jede Mulde pipettiert und die 96-well-Platte für 15 min. bei RT geschüttelt (Schüttelinkubator Ceromat HK, Krannich, Göttingen). Dadurch wurden die Zellen lysiert und das blaue Formazan gelöst. Anschließend konnte die Extinktion im Plattenphotometer (UVmax kinetic microplate reader, Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) bei 550 nm und ein Referenzwert bei 650 nm gemessen werden. Die äußeren, nur

mit Medium befüllten Kavitäten dienten als Leerwert. Der Mittelwert der Leerwerte wurde von den einzelnen Extinktionen abgezogen. Um verschiedene Experimente miteinander zu vergleichen, wurde der Kontrollwert gleich 100 % gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen.

2.7 Luciferase-Reportergen-Assay

Lösungen und Reagenzien:

1xPBS (s. 2.5.2)

Kratzpuffer

NaCl	150 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
Tris (pH 7,5)	40 mM

gelöst in Aqua bidest., titriert auf pH 7,6

Kaliumphosphat-Puffer (100 mM)

K ₂ HPO ₄	100 mM
KH ₂ PO ₄	100 mM

K₂HPO₄ (basisch) wurde mit KH₂PO₄ (sauer) auf einen pH von 7,8 titriert.

DTT (gelagert bei -20°C) 1 M

Glycylglycin-Puffer

Glycylglycin (pH 7,8)	25 mM
MgSO ₄	15 mM
EGTA (pH 8,0)	4 mM

gelöst in Aqua bidest., titriert auf pH 7,8, gelagert bei 4°C

Assay-Mix (für 24 Messproben)

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

Bis zur Verwendung auf Eis (4°C) gelagert.

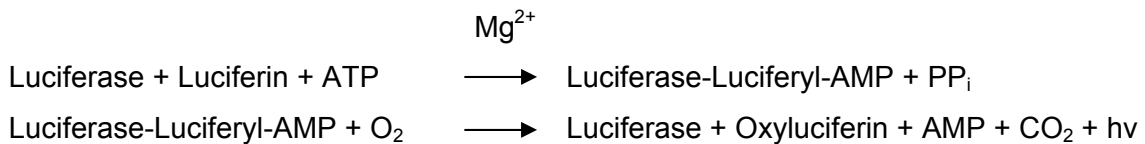
Luciferin-Mix (für 24 Messproben)

Glycylglycin-Puffer	5,6 ml
Luciferin (1 mM)	1,5 ml
DTT (1 M)	56 µl

Bis zur Verwendung lichtgeschützt auf Eis (4°C) gelagert.

Prinzip:

Im Luciferase-Assay wurden zwei Reporter-Gen-Plasmide eingesetzt, um die Promotoraktivierung zu messen: pSomCRE oder pG5E1B (s. 2.3.1). Beide Plasmide enthalten als Reporter das Gen für Luciferase. Mit dem Luciferase-Assay kann die Aktivität der produzierten Luciferase nachgewiesen und quantifiziert werden. Das Enzym Luciferase katalysiert in Anwesenheit von Magnesium und ATP die oxidative Decarboxylierung des Substrats Luciferin zu Oxyluciferin.



Dabei wird Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert, welches im Luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen werden kann und das bei Substratüberschuss proportional zur Luciferasemenge ist (De Wet et al. 1987).

Zusätzlich wurde das Reporter-Gen-Plasmid pGFP (s. 2.3.1) kotransfiziert. Das exprimierte Green-Fluorescent-Protein emittiert grüne Fluoreszenz bei Anregung mit Licht, die im Fluorometer quantitativ gemessen werden kann und ein Maß für die GFP-Menge der Probe ist. Es wird angenommen, dass intakte Zellen bei der Transfektion alle Plasmide mit der gleichen Wahrscheinlichkeit aufnehmen und exprimieren. Deshalb kann durch Messen des in den Proben vorhandenen GFPs die Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen bei Transfektion bestimmt werden (Reid und Flynn 1997).

Durchführung:

Für den normalen Luciferase-Assay wurden die HIT-T15-Zellen in einer Zelldichte von 2×10^6 /6-cm-Schale ausplattiert und je nach Fragestellung mit Hilfe der DEAE-Dextran Methode mit Plasmiden (pSomCRE, pGFP, pG5E1B, pCRG, pDLKwt, pDLKmut, pBS) transfiziert (s. 2.5.8.1). Anschließend konnten sie bei Bedarf mit Reagenzien behandelt werden (s. 2.5.9).

Für den siRNA-Luciferase-Assay wurden die HIT-T15-Zellen auf 6-well-Platten in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /Mulde ausplattiert (s. 2.5.7.3). Die Nukleinsäuren (pSomCRE, pGFP, siRNA Nr.23 gegen DLK, non-siRNA) wurden anschließend mit der METAFECTENETM Methode transfiziert (s. 2.5.8.1). Eine Behandlung mit Reagenzien erfolgte je nach Experiment (s. 2.5.9).

Zellernte und Herstellung der Zellextrakte:

Die Zellernte erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Arbeitsschritte fanden unter nicht-sterilen Bedingungen auf Eis statt und waren für beide Assays gleich. Sie unterschieden sich nur in den Volumina der eingesetzten Puffer auf Grund der unterschiedlich großen Zellzahl.

Das Komplett-Medium wurde von allen Schalen abgesaugt. Die Zellen wurden mit je 2 ml PBS gewaschen und dieses wieder abgesaugt. Dann wurde je 1 ml Kratzpuffer auf die Zellen gegeben, die adhären Zellen mit einem gummiertem Zellschaber (Greiner, Bio-one, Solingen, Deutschland) mechanisch vom Boden der Zellkulturschale gelöst und jede Probe einzeln in ein auf Eis vorgekühltes 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Damit möglichst alle Zellen in das Eppendorf-Reaktionsgefäß gelangten, wurde jede Schale mit 0,5 ml Kratzpuffer gespült. Die Zellsuspension wurde für 3 min. bei 4°C mit 7.000 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Dem kalten Kaliumphosphat-Puffer wurde DTT als Reduktionsmittel frisch zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 1 mM DTT entstand. In diesem Kaliumphosphat-DTT-Puffer wurde jedes Zellpellet re-suspendiert, für den Luciferase-Assay in je 150 µl und für den siRNA-Luciferase-Assay in je 100 µl. Die Zellen wurden lysiert, indem sie drei Mal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut und kräftig gevortext wurden. Die Zellen konnten nun entweder eingefroren werden oder für die Messung verarbeitet werden.

Die Zellextrakte wurden 3 min. bei 4°C mit 17.000 UpM zentrifugiert. Der so von den Zelltrümmern befreite Überstand enthielt die zytosolischen Proteine und wurde für die Messung der Luciferase-Aktivität und der GFP-Reportergen-Aktivität eingesetzt.

Messung der Luciferase-Aktivität:

Der Assay-Mix und der Luciferin-Mix mussten immer direkt vor jeder Messung neu angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert werden. Von jeder Probe wurden beim Luciferase-Assay 50 µl und beim siRNA-Luciferase-Assay 45 µl Zellextrakt mit je einer neuen Spitze in ein Luminometer-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Es wurden je 368 µl Assay-Mix hinzugegeben und beides durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Das Luminometer (Berthold, Bad Wildbad) konnte mit den Luminometer-Röhrchen und einer für alle Proben ausreichenden Menge Luciferin-Mix beschickt werden. Die Lichtmessung erfolgte automatisch nach einem festen Programm bei 560 nm Wellenlänge. Pro Probe erfolgte vor der eigentlichen Messung für 6 sec. eine sog. Nulleffekt-Vormessung zur Bestimmung des Hintergrundes. Dann wurden automatisch nacheinander in jedes Luminometer-Röhrchen 200 µl Luciferin-Mix hinzugegeben, was die oben beschriebene Reaktion startete und für 20 sec. die Lichtemission gemessen. Die Angabe der gemessenen Werte erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU), dabei waren die

RLU-Absolutwerte innerhalb eines Versuchs direkt miteinander vergleichbar. Sie galten als indirektes Maß für die transkriptionelle Aktivität des jeweiligen Genpromotors.

Messung der GFP-Reporter-gen-Aktivität:

Pro Probe wurden je 50 µl des Luciferase-Assay-Zellextrakts und je 45 µl des siRNA-Luciferase-Assay-Zellextrakts in die Mulden einer 96-well-Platte pipettiert. Dabei wurde jede zweite Mulde frei gelassen. Als Leerwert dienten 50 µl Kaliumphosphat-DTT-Puffer. Zur Messung der Fluoreszenz wurde GFP in einem computergesteuerten Fluorometer (Packard, Dreieich) mit Licht der Wellenlänge 485 nm angeregt. Das emittierte Licht wurde bei 530 nm Wellenlänge gemessen. Mit Hilfe einer Steuerungssoftware wurde dieses Signal mit 1100 Volt für eine Sekunde verstärkt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben, nachdem der Mittelwert der Leerwerte abgezogen wurde. RFU-Absolutwerte konnten innerhalb eines Versuchs miteinander verglichen werden. Waren die RFU-Werte in etwa gleich hoch, ließ sich daraus auf eine in allen Proben vergleichbare Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen schließen.

2.8 Immunfluoreszenz-Assay

Lösungen und Reagenzien:

Natriumborhydrid-Lösung 0,1 %

Natriumborhydrid	0,05 g
1xPBS-Puffer	50 ml

PBS-Puffer

s. Zellkultur 2.5.2

Rinderserum Albumin (BSA) 1 %

BSA	0,015 g
1xPBS-Puffer	1500 µl

Block-Puffer

Pferdeserum	10 %
BSA	1 % in PBS

Methanol 100 %

aufbewahrt bei -20°C

Einbettungsmedium

Roti-Histokitt

DAPI (4',6-Diaminidino-2-Phenylindol) Mounting Medium

DAPI	1,5 µg/ml
<i>Exzitationswellenlänge:</i>	360 nm
<i>Emissionswellenlänge:</i>	460 nm

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Anwendung
Primär	Cleaved-Caspase-3(Asp175)-Rabbit-Antibody	1:50 1:25	Einzelfärbung Doppelfärbung
Primär	Anti-FLAG™-M2-Monoclonal-Mouse-Antibody	1:2000	Doppelfärbung
Primär	Anti-DLK-Polyclonal-Rabbit-Antibody	1:50	endogene DLK-Färbung
Sekundär	Alexa Fluor™-488-labeled Goat-Anti-Rabbit-IgG-Antibody <i>Exzitationswellenlänge: 495 nm</i> <i>Emissionswellenlänge: 519 nm</i>	1:50	Einzelfärbung Doppelfärbung endogene DLK-Färbung
Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Anwendung
Sekundär	Tetramethylrhodamine-labeled Goat-Anti-Mouse-IgG-Antibody <i>Exzitationswellenlänge: 555 nm</i> <i>Emissionswellenlänge: 580 nm</i>	1:200	Doppelfärbung

Tab. 2.4: Liste der eingesetzten Antikörper. Alle Antikörper-Verdünnungen wurden in 1 % BSA in PBS angesetzt.

Prinzip:

Im Immunfluoreszenz-Assay wurden bestimmte Proteine in HIT-T15-Zellen immunzytochemisch dargestellt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht.

In der Immunzytochemie werden zur Darstellung der Expression und zellulären Lokalisation verschiedener Proteine in intakten, fixierten Zellen Antikörper und daran gekoppelte Farbstoffe verwendet. Für alle durchgeführten Färbungen wurde die indirekte Immunzytochemie angewandt. Dabei wird zuerst ein primärer Antikörper, der an das zu untersuchende Antigen bindet, eingesetzt. Anschließend kann ein sekundärer Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist, aufgebracht werden. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluorochrom konjugiert, das bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitationswellenlänge) selbst Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert (Emissionswellenlänge). Diese Fluoreszenz entsteht, da das Fluorochrom durch die Anregung mit Licht Photonen absorbiert und diese aufgenommene Energie durch Emission von anderen Photonen wieder abgibt, um in seinen energetischen Grundzustand zurückkehren. Dabei unterscheiden sich die Wellenlängen von ab-

sorbiertem und emittiertem Licht, so dass sie durch optische Filter getrennt werden und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen) auf das zu untersuchende Antigen überprüft werden können.

Eingesetzte Antikörper:

Für die jeweiligen Immunzytochemieversuche wurden entsprechend der Fragestellung verschiedene primäre und sekundäre Antikörper verwendet.

Um apoptotische Zellen nachzuweisen, wurde der Cleaved-Caspase-3(Asp175)-Antikörper eingesetzt. Caspase-3 bildet die Endstrecke der Apoptose-Induktion. Sie liegt als Procaspase-3 inaktiv in der Zelle vor und wird erst durch übergeordnete Caspasen mittels limitierter Proteolyse aktiviert. Der Cleaved-Caspase-3(Asp175)-Antikörper detektiert das große Fragment aktivierter Caspase, welches durch Spaltung nach dem Aspartat 175 entsteht, erkennt aber nicht die inaktive Procaspase-3. Der Cleaved-Caspase-3-Antikörper wurde für die Einzelfärbung im Verhältnis 1:50 eingesetzt und für die Doppelfärbung in der Verdünnung 1:25 zusammen mit dem 1:2000 verdünnten Anti-FLAGTM-M2-Monoclonal-Antibody genutzt. Der Anti-FLAGTM-M2-Monoclonal-Antibody bindet an FLAG-Fusionsproteine, hier an mit einem FLAG-Epitop markierte DLK. So konnten Zellen, die positiv für transfizierte DLK sind, nachgewiesen werden. Um dagegen endogene, also in den Zellen schon vorhandene DLK, zu detektieren wurde der Anti-DLK-Polyclonal-Rabbit-Antibody eingesetzt, welcher gegen die 223 C-terminal gelegenen Aminosäuren der DLK gerichtet ist.

Die sekundären fluoreszenz-markierten Antikörper konnten bei Bedarf in Kombination mit unterschiedlichen primären Antikörpern eingesetzt werden.

Der eine grüne Fluoreszenz emittierende Alexa-FluorTM-488-markierte Anti-Rabbit-Antikörper diente als sekundärer Antikörper sowohl gegen den Cleaved-Caspase-3-Antikörper in Einzel- und Doppelfärbung als auch gegen den Anti-DLK-Antikörper in der Verdünnung 1:50. Als sekundärer Antikörper gegen den Anti-FLAG-Antikörper wurde ein mit Tetramethylrhodamine markierter Anti-Mouse-Antikörper verwendet, der rote Fluoreszenz emittierte.

Durchführung:

Unter sterilen Bedingungen wurden 6-well-Platten mit runden Deckgläschen, auf denen die Zellen anwachsen sollten, bestückt. Dann wurden die HIT-T15-Zellen wie in 2.5.7.4 beschrieben so ausplattiert, dass eine Zelldichte von $1 \times 10^6 / 2$ ml/Mulde resultierte. Anschließend konnten die Zellen bei Bedarf mit Hilfe der METAFECTENETM Methode transfiziert werden. Dabei wurden je nach Versuchsprotokoll die Plasmide pDLKwt, pDLKmut

oder pBluescript eingesetzt (s. 2.5.8.1). Eine Behandlung der Zellen mit Reagenzien (IL-1 β , TNF- α) erfolgte frühestens zwei Stunden später (s. 2.5.9).

Die Zellen wurden anschließend für 48 h oder 72 h inkubiert. Nun konnten die Antikörper aufgetragen werden. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter nicht sterilen Bedingungen. Zuerst wurde der Überstand abgesaugt und die mit den HIT-T15-Zellen bewachsenen Deckgläschen in neue 6-well-Platten überführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer bei RT für 5 min. gewaschen und der Überstand wieder abgesaugt. Anschließend wurden sie mit je 4 ml -20°C kalten Methanol pro Mulde für 10 min. fixiert. Nun wurden die Zellen drei Mal für 5 min. bei RT mit je 4 ml PBS gespült. Um unspezifische Proteinbindungen und damit unerwünschte Hintergrundsignale zu unterdrücken, wurden die HIT-T15-Zellen mit jeweils 4 ml 0,1-%igem Natriumborhydrid über 5 min. inkubiert. Nach Entfernung des Natriumborhydrids wurden sie wieder drei Mal für 5 min. mit PBS gewaschen. Durch 45 min. Inkubation bei RT mit 3 ml Block-Puffer pro Mulde konnten noch übrige unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden. Der Block-Puffer wurde abgesaugt und die Zellen durch einmaliges Waschen mit PBS von Pufferresten befreit. Nun konnten die primären Antikörper wie gewünscht in 1 % BSA in PBS verdünnt und auf die Zellen aufgetragen werden. Es folgte eine Inkubation mit den primären Antikörpern bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Zellen von ungebundenem primärem Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min. befreit. Danach wurden die Zellen mit den ebenfalls in 1 % BSA in PBS verdünnten sekundären Antikörpern für 30 min. lichtgeschützt inkubiert. Anschließend folgte dreimaliges lichtgeschütztes Waschen mit PBS. Nun wurden die Deckgläschen mit Hilfe des Einbettungsmediums Roti Histokitt auf Objektträgern (Knittel Gläser, Glasbearbeitungs-GmbH Braunschweig) fixiert. Um Zellkerne darzustellen, wurde stattdessen das DAPI-(4',6-Diaminidino-2-Phenylindol)-Mounting-Medium benutzt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die kleine Furche der DNA bindet und bei spezifischen Wellenlängen blau fluoresziert.

Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200, Openlab Imaging Software) bei den für die sekundären Antikörper entsprechenden Wellenlängen (s. Tab.2.4) untersucht. Für den Alexa FluorTM-488-markierten Anti-Rabbit-Antikörper wurde die Exzitationswellenlänge von 495 nm und die Emissionswellenlänge von 519 nm benutzt. Er emittierte eine grüne Fluoreszenz, mit der entweder der Cleaved-Caspase-3 Rabbit-Antikörper als Apoptosemarker oder der Anti-DLK-Rabbit-Antikörper als Marker für endogene DLK dargestellt werden konnte. Für den Tetramethylrhodamine-markierten Anti-Mouse-Antikörper wurde die Exzitationswellenlänge von 555 nm und die Emissionswellenlänge von 580 nm benutzt. Er emittierte eine rote Fluoreszenz, mit der der Anti-

FLAGTM-M2-Mouse-Antikörper zum Nachweis von FLAG-Epitop markierter, transfizierter DLK dargestellt werden konnte.

Für jede Probe, also jedes auf einem Objektträger fixierte mit HIT-T15-Zellen bewachsene Deckgläschen, wurden 10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte mit insgesamt ca. 300 - 400 Zellen fotografiert. Bei Doppel-Immunfluoreszenz-Versuchen wurden je Bildausschnitt vier Bilder gemacht: ein Bild im Durchlicht, um die Gesamtzahl Zellen zu bestimmen, ein Bild in der Emissionswellenlänge des ersten sekundären Antikörpers, ein Bild in der Emissionswellenlänge des zweiten sekundären Antikörpers und ein Bild in dem die mit beiden Antikörpern dargestellten Zellen übereinander gelegt wurden (Merge). Bei Einfach-Immunfluoreszenz-Versuchen wurden entsprechend zwei Bilder je Bildausschnitt gemacht. Die Zellen wurden manuell auf Ausdrucken ausgezählt. Dabei wurden die Gesamtzahl der Zellen (Bildausschnitt Durchlicht) und je nach Fragestellung Zellen mit folgenden Eigenschaften ausgezählt: Caspase-3-positive-Zellen, transfizierte FLAG-markierte DLK-positive-Zellen und Zellen, die für beides positiv waren. Pro Experiment in Einfachbestimmung entsprach dies einer Gesamtzahl von 1.800 - 2.400 ausgezählten Zellen. Jedes Experiment wurde drei Mal in Doppelbestimmung durchgeführt (n = 6).

Für Experimente, in denen keine DNA transfiziert wurde und für die Proben, die nur mit pBluescript transfiziert wurden, wurde die Zahl der Caspase-3-positiven-Zellen in Prozent der Gesamtzahl gezählter Zellen berechnet und grafisch dargestellt. Für Experimente, in denen pDLKwt oder pDLKmut transfiziert wurden, wurden die Caspase-3-positiven-Zellen als Prozent der Anzahl DLK-positiver-Zellen berechnet und dargestellt. Die Zahl der DLK-positiven-Zellen als Prozent aller gezählten Zellen ergab die jeweilige Transfektionseffizienz.

2.9 Statistik

Für die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse wurde aus der Anzahl der Messergebnisse identisch behandelte Proben (meist n = 6) jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts ($SEM = SD/\sqrt{n}$) berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Um die Signifikanz zu überprüfen, wurde der ungepaarte Student's-t-Test angewandt. Alle Rechnungen erfolgten mit Hilfe von Excel. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von Sigma-Plot, Version 8.0 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis endogener DLK in HIT-T15-Zellen

Die Fragestellung nach der Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β war auch im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus mit der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (DLK) zu untersuchen. Daher sollte zuerst die endogene DLK in der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 nachgewiesen werden. Immunzytochemisch wurden die Zellen mit einem primären Antikörper (Anti-DLK-Polyclonal-Rabbit-Antibody), der gegen die 223 C-terminal gelegenen Aminosäuren der DLK gerichtet war (Holzman et al. 1994) und einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper (Alexa-Fluor™-488 Anti-Rabbit) gefärbt (s. 2.8.2). Der Zellkern wurde mit dem an der kleinen Furche der DNA-Helix bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt. DAPI und damit die Zellkerne fluoreszierten blau. In Abb. 3.1 ist die Färbung der endogenen DLK und der Zellkerne in fluoreszenzmikroskopischen Bildern dargestellt.

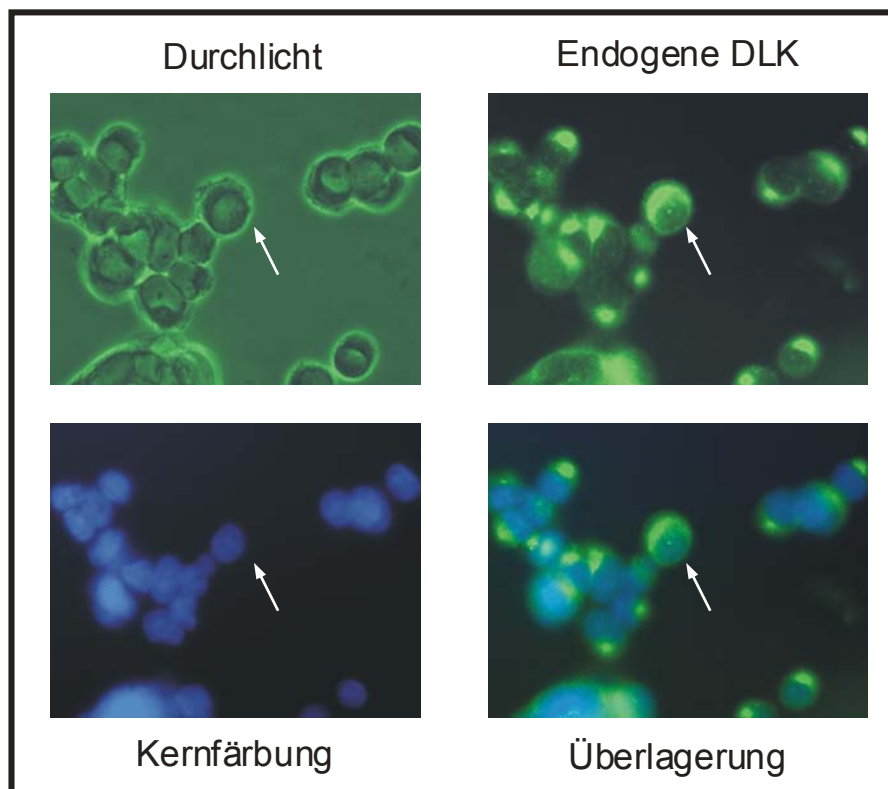


Abb. 3.1: Nachweis endogener DLK in HIT-T15-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HIT-T15-Zellen. Endogene DLK fluoreszierte grün, die Zellkerne fluoreszierten blau. Die Pfeile zeigen auf eine besonders gut zu erkennende Zelle. In jeder Zelle war endogene DLK vorhanden. Ohne Behandlung schien die endogene DLK perinukleär im Zytosol lokalisiert zu sein.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde in einem Bildausschnitt zuerst die Anzahl der Zellen im Durchlicht dargestellt. Für denselben Bildausschnitt wurden die grüne Fluoreszenz der endogenen DLK und die blau fluoreszierenden Zellkerne eingestellt. Es konnte endogene DLK in allen untersuchten HIT-T15-Zellen nachgewiesen werden. Durch Überlagerung der Bilder konnte festgestellt werden, dass die endogene DLK im Zustand ohne Zytokin-Behandlung perinukleär im Zytosol lokalisiert zu sein scheint.

3.2 Der Effekt von TNF- α und IL-1 β auf die CRE- und CREB-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β auf die CRE- und CREB-abhängige Gentranskription sollte untersucht werden. Dazu wurden Luciferase-Reporter-Gen-Assays durchgeführt und die Aktivität der exprimierten Luciferase im Lumimeter quantifiziert (s. 2.7.2).

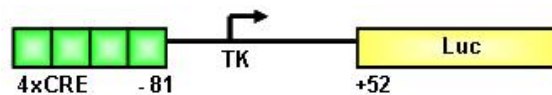


Abb. 3.2 A: Schematische Darstellung des Reporter-Plasmids p4xSomCRET81Luc (modifiziert nach Oetjen et al. 2006)

Um die Transkription CRE-abhängiger Gene zu untersuchen, wurde das Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid p4xSomCRET81Luc (pSomCRE) eingesetzt (Oetjen et al. 1994). Endogene CRE-bindende Proteine konnten an die vier Kopien der CRE-Sequenz, die an den minimalen Promotor der Thymidin-Kinase des Herpes-Simplex-Virus gekoppelt sind, binden und die Luciferase-Expression stimulieren (s. 2.3.1).

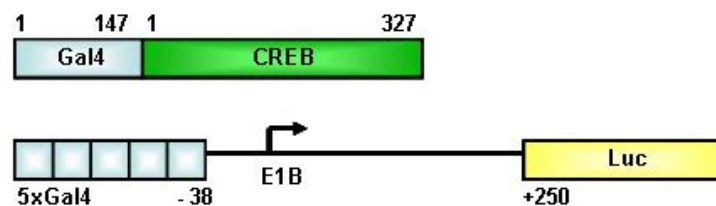


Abb. 3.2 B: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGAL4-CREBfl und des Reporter-Plasmids p5xGal4E1BLuc (modifiziert nach Oetjen et al. 2006)

Um die Transkription CREB-abhängiger Gene zu untersuchen, wurden das Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid p5xGal4E1BLuc (pG5E1B) und der Expressionsvektor pGAL4-CREBfl (pCRG), der für ein Fusionsprotein kodiert, eingesetzt (Oetjen et al. 2006). Das Fusionsprotein bestand aus der DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 und CREB-327 in voller Länge. Es konnte an die fünf Kopien der DNA-Bindungsstelle für Gal4, die von dem minimalen Promotor des Adenovirus E1B kontrolliert wurden, binden

und die Luciferase-Expression stimulieren (s. 2.3.1). So konnte spezifisch die Funktion von CREB ohne Beeinflussung durch endogene CRE-bindende Proteine untersucht werden. Zusätzlich wurde jeweils zur Kontrolle der Transfektionseffizienz das Reporter-Gen-Plasmid pGFP kotransfiziert (s. 2.7.2).

Die HIT-T15-Zellen wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran mit den Plasmiden transfiziert und für 48 h inkubiert. In den 24 h vor der Ernte wurden die Zellen mit TNF- α oder IL-1 β behandelt und ggf. 6 h vor der Ernte mit Kaliumchlorid (KCl) oder Forskolin (FSK) stimuliert. Kaliumchlorid führte zu einer Membrandepolarisation, wodurch die spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ geöffnet wurden und es zu einem intrazellulären Calciumanstieg kam. Forskolin führte zur Aktivierung der Adenylatcyclase, wodurch es zu einem Anstieg des zweiten Botenstoffs cAMP in der Zelle kam.

3.2.1 Beeinflussung der stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription durch TNF- α

In Abb. 3.3 ist die Wirkung ansteigender Konzentrationen TNF- α auf die mit KCl oder Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription dargestellt. Die HIT-T15-Zellen wurden transient mit pSomCRE und pGFP transfiziert. Die Behandlung erfolgte mit 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml TNF- α für 24 h und mit 10 μ M Forskolin oder 40 mM KCl für 6 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Experiment wurde drei Mal in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Behandlung der Zellen nur mit Forskolin oder nur mit KCl erhöhte die CRE-abhängige Gentranskription um das 28,6-Fache bzw. um das 2,8-Fache. Die Mittelwerte dieser Kontrolle mit Forskolin oder KCl ohne TNF- α entsprachen 100 %, alle übrigen Werte wurden darauf bezogen.

Im Vergleich zur durch Forskolin stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription wurde die KCl-stimulierte Gentranskription signifikant durch steigende Konzentrationen von TNF- α gehemmt. Die Inkubation mit 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF- α führten zur Abnahme der KCl-stimulierten relativen Luciferase-Aktivität auf $72,06 \pm 12,99$ % bzw. $38,96 \pm 10,63$ % ($p=0,0003$). Durch Behandlung mit 100 ng/ml TNF- α wurde die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription um insgesamt 83,44 % auf ein Minimum von $16,56 \pm 9,78$ % ($p=0,00001$) reduziert. Einsatz von 1000 ng/ml TNF- α führte zu $19,21 \pm 4,99$ % KCl-stimulierter relativer Luciferase-Aktivität ($p=0,00000008$).

Die Forskolin-stimulierte relative Luciferase-Aktivität wurde durch 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF- α im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert ($97,64 \pm 6,88$ % bzw. $100,76 \pm 3,9$ %). Behandlung mit 100 ng/ml bzw. 1000 ng/ml führte zu einer Reduktion auf

77,44 ± 16,32 % bzw. 79,71 ± 15,56 %, die im Vergleich zur Kontrolle ohne TNF- α ebenfalls nicht signifikant war.

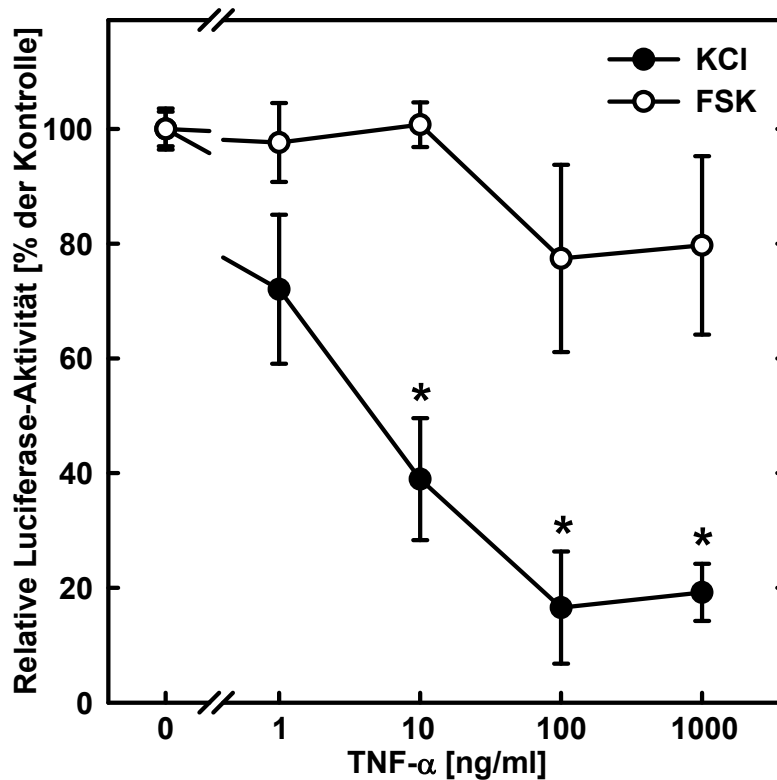


Abb. 3.3: Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 1 μ g pSomCRE und 0,5 μ g pGFP je Mulde mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Anschließend wurden sie für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (1, 10, 100, 1000 ng/ml) und ggf. 6 h mit 10 μ M Forskolin oder 40 mM KCl behandelt. Die Mittelwerte der nicht mit TNF- α , aber mit Forskolin oder KCl behandelten Zellen entsprachen 100 %, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. Vergleich der Werte ansteigender TNF- α Konzentrationen mit dem unstimulierten Kontrollwert innerhalb der Stimulations-Gruppe im ungepaarten Student's *t*-Test (* p <0.05).

3.2.2 Beeinflussung der stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription durch TNF- α

In Abb. 3.4 ist der Effekt ansteigender Konzentrationen TNF- α auf die mit KCl oder Forskolin stimulierte CREB-abhängige Gentranskription dargestellt. HIT-T15-Zellen wurden transient mit pG5E1B und pCRG transfiziert, die Zellen wurden mit 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml TNF- α für 24 h inkubiert und mit 10 μ M Forskolin oder 40 mM KCl für 6 h behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Experiment wurde drei Mal in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Behandlung der Zellen nur mit Forskolin oder nur mit KCl erhöhte die CREB-abhängige Gentranskription um das 28,2-Fache bzw. um das 2,7-Fache. Die Mittelwerte

dieser Kontrolle mit Forskolin oder KCl ohne TNF- α wurden als 100 % definiert, alle übrigen Werte wurden darauf bezogen.

TNF- α führte konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Hemmung der KCl-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription im Vergleich zur Forskolin-stimulierten Gentranskription. Eine Behandlung mit 1 ng/ml bzw. mit 10 ng/ml TNF- α führte zur Abnahme der KCl-stimulierten relativen Luciferase-Aktivität auf $89,32 \pm 11,23$ % bzw. auf $67,89 \pm 9,1$ % ($p=0,04$). Inkubation mit 100 ng/ml und 300 ng/ml TNF- α reduzierte die KCl-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription weiter auf $50,41 \pm 5,84$ % ($p=0,002$) bzw. $38,76 \pm 4,32$ % ($p=0,0004$). Die Forskolin-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription wurde durch 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF- α auf $111,75 \pm 3,04$ ($p=0,007$) bzw. $106,92 \pm 6,9$ im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Behandlung mit 100 ng/ml und 300 ng/ml TNF- α führte zu einer Reduktion der Forskolin-stimulierten relativen Luciferase-Aktivität auf $86,2 \pm 7,25$ % bzw. $82,71 \pm 7,38$ % ($p=0,04$).

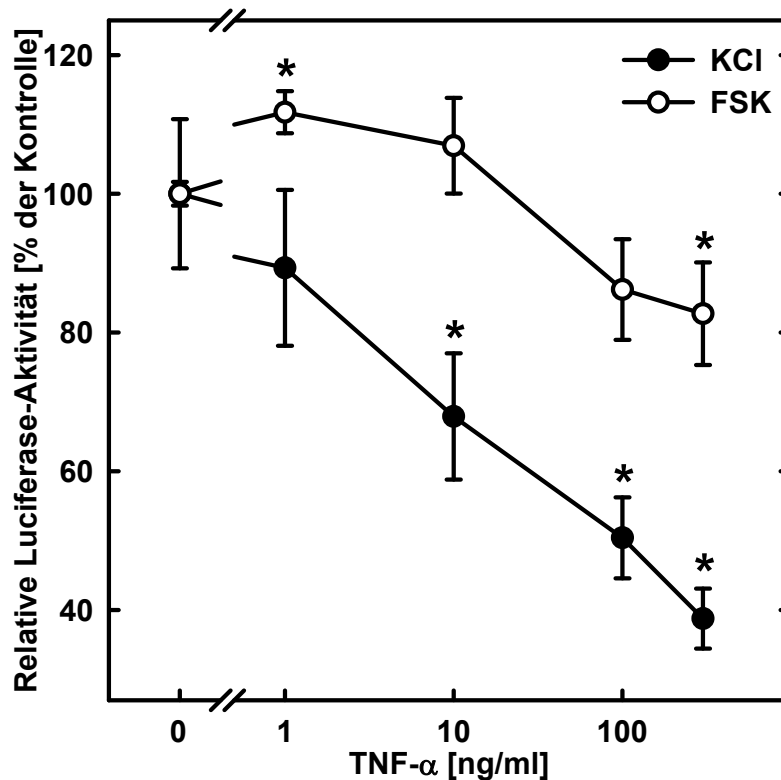


Abb. 3.4: Wirkung ansteigender Konzentrationen von TNF- α auf die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pCRG, 2 μ g pG5E1B und 0,75 μ g pGFP je Mulde mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Anschließend wurden sie für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (1, 10, 100, 300 ng/ml) und ggf. 6 h mit 10 μ M Forskolin oder 40 mM KCl behandelt. Die Mittelwerte der nicht mit TNF- α , aber mit Forskolin oder KCl behandelten Zellen entsprachen 100 %, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. Vergleich der Werte ansteigender TNF- α Konzentrationen mit dem unstimulierten Kontrollwert innerhalb der Stimulations-Gruppe im ungepaarten Student's t -Test (* $p<0,05$).

3.2.3 Vergleich des Effekts von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante auf die Wirkung von TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription

Es sollte die Wirkung von TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von DLK-Wildtyp (DLKwt), DLK-Mutante K185A (DLKmut) oder Bluescript (BS) verglichen werden. Dazu wurden HIT-T15-Zellen mit 2 μ g pSomCRE, 0,75 μ g pGFP und zusätzlich mit je 2 μ g DLKwt, DLKmut oder BS pro Mulde transfiziert. Durch DLKwt wurde die Wildtyp-DLK in den Zellen überexprimiert, um ihre Wirkung besser untersuchen zu können. Durch Transfektion von DLKmut wurde die Kinase-tote DLK-Mutante K185A überexprimiert, sie besitzt keine Kinase-Aktivität, da in der ATP-Bindungsdomäne das Lysin 185 gegen Alanin durch eine Punktmutation ausgetauscht wurde (Holzman et al. 1994). Da DLK im aktiven Zustand Dimere aus zwei DLK-Molekülen bildete, konnte durch Überexpression der Kinase-toten DLK-Mutante auch ein Teil der endogenen DLK-Wirkung aufgehoben werden. Zur Kontrolle wurde mit Bluescript ein Leervektor ohne relevante genetische Information transfiziert. Für jede DNA-Gruppe (BS, DLKwt und DLKmut) gab es vier Behandlungen: Die Zellen wurden nicht behandelt (Kontrolle), nur mit 40 mM KCl für 6 h, nur mit 30 ng/ml TNF- α für 24 h oder mit KCl und TNF- α behandelt. Es wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten dargestellt. Die Wirkung von DLKwt und DLKmut im Vergleich zu Bluescript auf die unstimulierte CRE-abhängige Gentranskription mit und ohne TNF- α -Behandlung ist in Tabelle 3.1 dargestellt. In An- und Abwesenheit von TNF- α verminderte Überexpression von DLKwt die unstimulierte CRE-abhängige Gentranskription, Überexpression der Kinase-toten DLK-Mutante erhöhte sie.

Ohne KCl-Stimulation	BS (SEM)	DLKwt (SEM)	DLKmut (SEM)
Nur Basalaktivität	1 (\pm 0,01)	0,93 (\pm 0,12)	1,8 (\pm 0,31)
Behandlung mit 30 ng/ml TNF- α	1 (\pm 0,02)	0,77 (\pm 0,12)	1,37 (\pm 0,31)

Tab. 3.1: Beeinflussung der CRE-abhängigen Gentranskription durch DLKwt oder DLKmut. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pSomCRE, 0,75 μ g pGFP und je 2 μ g BS, DLKwt oder DLKmut transfiziert. Anschließend wurden sie je in Anwesenheit von BS, DLKwt und DLKmut nicht behandelt (Kontrolle), mit 40 mM KCl für 6h, mit 30 ng/ml TNF- α für 24 h oder mit KCl + TNF- α behandelt. Dargestellt ist die Wirkung der transfizierten DNA (DLKwt oder DLKmut) im Vergleich zum Leervektor Bluescript in An- und Abwesenheit von TNF- α (Werte aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung \pm SEM).

In Abb. 3.5 ist die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription dargestellt.

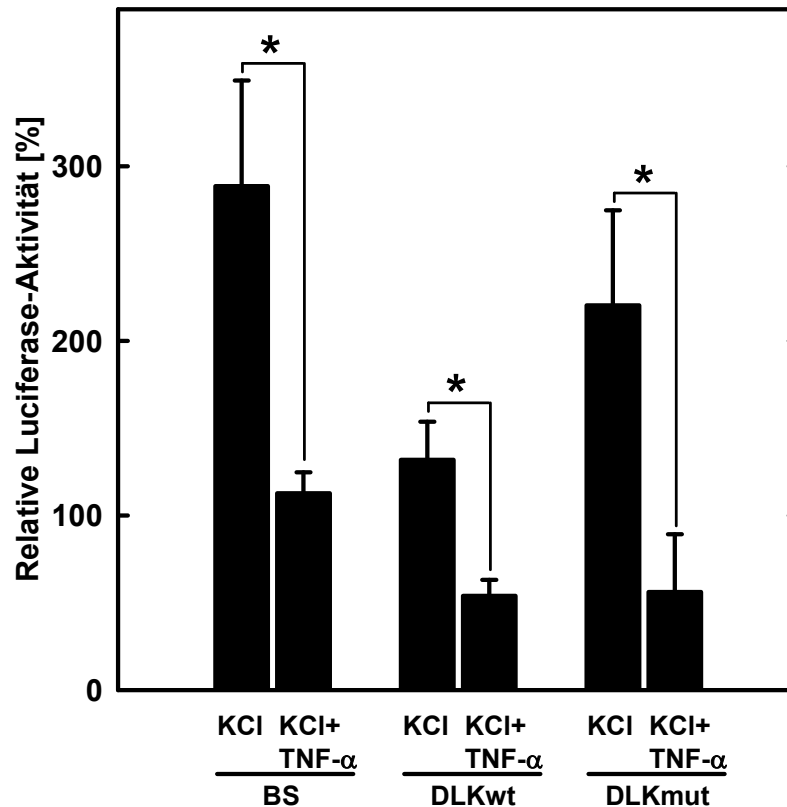


Abb. 3.5: Die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von Wildtyp-DLK, DLK-Mutante oder Bluescript. Im Luciferase-Reportergen-Assay wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μg pSomCRE, 0,75 μg pGFP und je 2 μg BS, DLKwt oder DLKmut transfiziert. Anschließend wurden sie je in Anwesenheit von BS, DLKwt und DLKmut nicht behandelt (Kontrolle), mit 40 mM KCl für 6h, mit 30 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ für 24 h oder mit KCl + $\text{TNF-}\alpha$ behandelt. Die Mittelwerte un behandelter Zellen je Gruppe entsprachen 100 %. Dargestellt ist die Differenz aus KCl und dem Kontrollwert bzw. KCl + $\text{TNF-}\alpha$ und dem $\text{TNF-}\alpha$ -Wert. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p < 0.05$, ungepaarter Student's t -Test.

Für jede DNA-Gruppe wurde die un behandelte Kontrolle als 100 % definiert (nicht abgebildet) und die übrigen Werte dazu prozentual ausgedrückt. Die Behandlung nur mit KCl steigerte die CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von Bluescript auf $388,63 \pm 60,52$ %, in Anwesenheit von DLKwt auf $231,86 \pm 21,75$ % und in Anwesenheit von DLKmut auf $320,36 \pm 56,44$ % (nicht abgebildet). Es wurden für BS, DLKwt und DLKmut jeweils Differenzen abgebildet. Um den Effekt allein durch KCl zu verdeutlichen, wurde der un behandelte Kontrollwert vom mit KCl behandelten Wert subtrahiert. Um den Effekt von $\text{TNF-}\alpha$ auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription zu verdeutlichen, wurde der nur mit $\text{TNF-}\alpha$ behandelte Wert vom mit $\text{TNF-}\alpha$ + KCl behandelten Wert subtrahiert. Die Differenz der KCl-induzierten Steigerung der CRE-abhängigen

Gentranskription in Anwesenheit von BS betrug $288,63 \pm 60,52$ %. In Anwesenheit von DLKwt bzw. DLKmut betrug die Differenz der KCl-stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription $131,86 \pm 21,75$ % bzw. $220,36 \pm 54,44$ %. Durch den Einsatz von 30 ng/ml TNF- α wurde die KCl-stimulierte Gentranskription in Anwesenheit von allen drei eingesetzten DNAs gesenkt. Die Differenz der Wirkung von TNF- α zeigte eine Verminderung der KCl-stimulierten Gentranskription durch TNF- α in Anwesenheit von BS auf $112,65 \pm 12,07$ % ($p=0,02$), in Anwesenheit von DLKwt auf $53,94 \pm 9,19$ % ($p=0,008$) und in Anwesenheit von DLKmut auf $56,16 \pm 33$ % ($p=0,03$).

3.2.4 Die Wirkung von TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von DLK-Mutante oder Bluescript-DNA

In Abb. 3.6 ist die Wirkung von ansteigenden Konzentrationen TNF- α auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von der Kinase-toten DLK-Mutante K185A oder dem Leervektor Bluescript dargestellt. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pSomCRE, 0,75 μ g pGFP und entweder mit 2 μ g DLKmut oder 2 μ g BS transient transfiziert. Anschließend wurden sie für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (1, 10, und 100 ng/ml) und für 6 h mit 40 mM KCl behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Experiment wurde drei Mal in Doppelbestimmung durchgeführt. Im Vergleich mit unstimulierten Zellen erhöhte die Behandlung der Zellen mit KCl die CRE-abhängige Gentranskription der mit Bluescript transfizierten Zellen um das $4,9 \pm 1,3$ -Fache und die der mit der DLK-Mutante transfizierten Zellen um das $4 \pm 1,3$ -Fache. Pro Gruppe entsprachen die Mittelwerte dieser nur mit KCl stimulierten Zellen 100 %, alle übrigen Werte wurden darauf bezogen.

In Anwesenheit des Leervektors Bluescript wurde die KCl-stimulierte Gentranskription durch 1 ng/ml und 10 ng/ml TNF- α auf $93,5 \pm 15,12$ bzw. $51,6 \pm 8,88$ % ($p=0,001$) vermindert. Inkubation mit 100 ng/ml TNF- α senkte die stimulierte relative Luciferase-Aktivität auf ein Minimum von $25 \pm 5,61$ % ($p=0,000003$). In Anwesenheit der DLK-Mutante führte die Inkubation mit 1 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF- α zu einer Reduktion der KCl-stimulierten relativen Luciferase-Aktivität auf $79,5 \pm 20,33$ % bzw. $39,9 \pm 13,29$ % ($p=0,002$). Behandlung mit 100 ng/ml TNF- α senkte die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription auf ein Minimum von $29,9 \pm 5,73$ % ($p=0,000003$).

Insgesamt unterschied sich die konzentrationsabhängige Reduktion der KCl-stimulierten Gentranskription durch TNF- α in Anwesenheit der Kinase-toten DLK-Mutante oder dem Leervektor voneinander nicht signifikant.

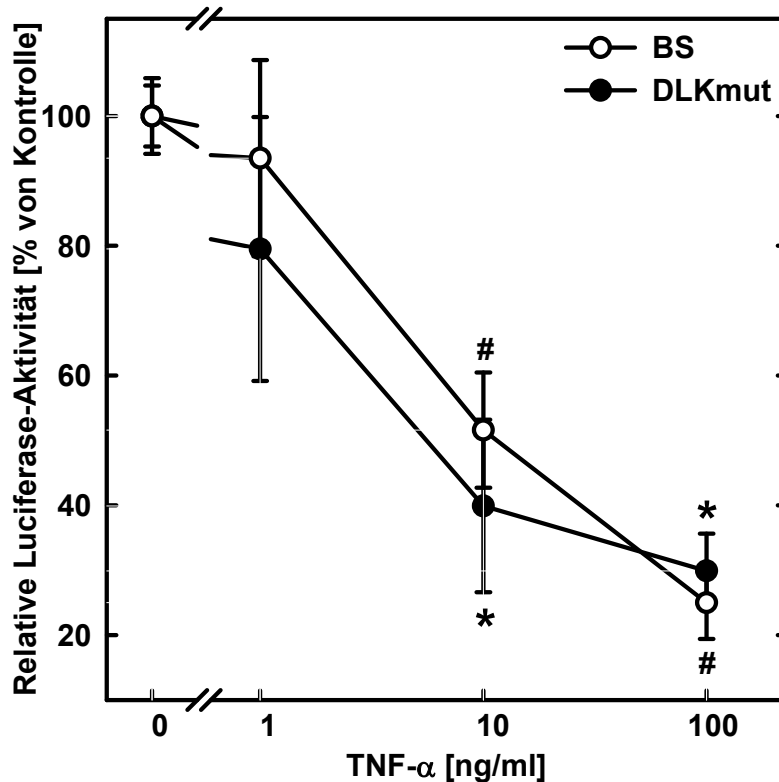


Abb. 3.6: Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von DLKmut oder BS. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pSomCRE, 0,75 μ g pGFP und entweder 2 μ g DLKmut oder 2 μ g BS transient transfiziert. Daraufhin wurden sie über 24 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (1, 10, 100 ng/ml) und 6 h mit 40 mM KCl behandelt. Die Mittelwerte der nicht mit TNF- α , aber mit KCl behandelten Zellen entsprachen 100 %, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. # p <0.05 bezeichnet den Vergleich der Kontrolle (BS-Transkription) in Abwesenheit von TNF- α gegenüber ansteigenden Konzentrationen von TNF- α , * p <0.05 steht für denselben Vergleich in Anwesenheit von DLKmut, ungepaarter Student's t -Test.

3.2.5 Beeinflussung der stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription durch IL-1 β

Es sollte der Effekt ansteigender Konzentrationen von IL-1 β auf die mit KCl oder Forskolin stimulierte CREB-abhängige Gentranskription untersucht werden. Die HIT-T15-Zellen wurden transient mit pG5E1B und pCRG transfiziert, mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β (1, 3, 10, 30 und 100 ng/ml) für 24 h inkubiert und mit 40 mM KCl oder mit 10 μ M Forskolin für 6 h behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit KCl oder Forskolin behandelt wurden, alle Kontrollwerte wurden als Prozent vom Kontrollwert ohne IL-1 β Behandlung, der 100 % entsprach, ausgedrückt. Die Behandlung der Zellen nur mit KCl oder Forskolin erhöhte die CREB-abhängige Gentranskription um das $4,3 \pm 0,2$ -Fache

bzw. das $33,6 \pm 1,4$ -Fache, dieser Mittelwert entsprach 100 %, alle KCl- bzw. Forskolin-stimulierten Werte wurden darauf bezogen.

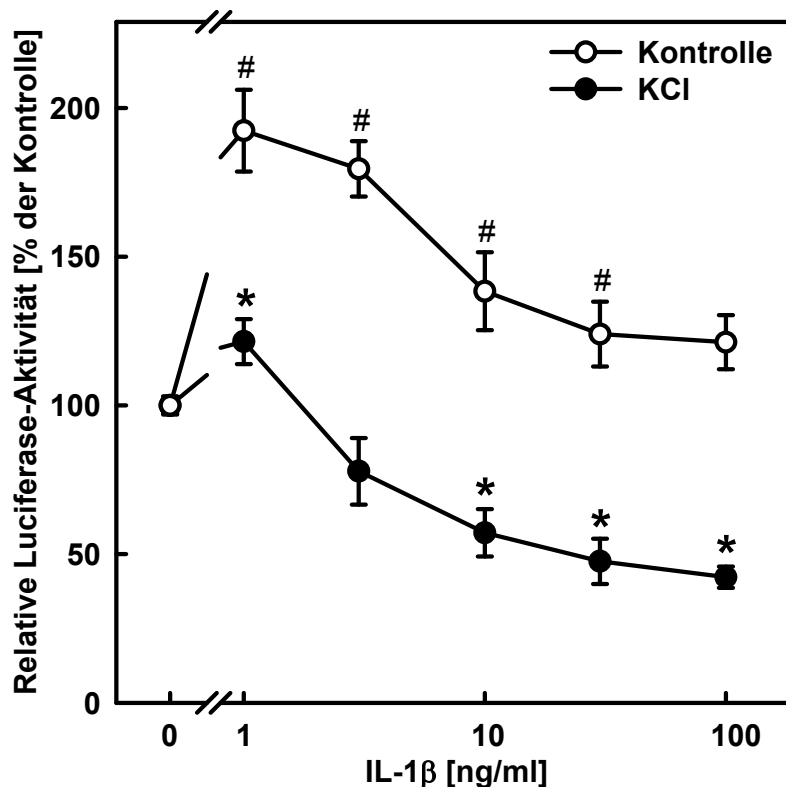


Abb. 3.7 A: Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β auf die durch Membran-depolarisation stimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pCRG, 2 μ g pG5E1B und 0,75 μ g pGFP transient transfiziert. Anschließend wurden sie über 24 h mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β (1, 3, 10, 30, 100 ng/ml) und ggf. 6 h mit 40 mM KCl behandelt. Für die Kontrolle (ohne KCl) und die mit KCl behandelten Werte wurden jeweils die nicht mit IL-1 β behandelten Werte als 100 % definiert, die anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. # $p < 0,05$ bezeichnet den Vergleich der Kontrolle (keine KCl-Behandlung) in Abwesenheit von IL-1 β gegenüber ansteigenden Konzentrationen von IL-1 β , * $p < 0,05$ steht für denselben Vergleich in Anwesenheit von KCl-Behandlung, ungepaarter Student's t -Test.

Abb. 3.7 A: Die KCl-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription wurde durch Inkubation mit 1 und 3 ng/ml IL-1 β erst gesteigert auf $121,46 \pm 7,57$ % ($p = 0,02$) und dann vermindert auf $77,86 \pm 11,18$ %. Behandlung mit 10, 30 und 100 ng/ml IL-1 β führte zu einer weiteren Reduktion der KCl-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription auf $57,17 \pm 7,97$ % ($p = 0,0005$), $47,56 \pm 7,59$ % ($p = 0,00007$) und $42,22 \pm 3,59$ % ($p = 0,0000002$). Behandlung der unstimulierten Kontrolle mit 1 und 3 ng/ml IL-1 β führte zu einer Steigerung der relativen Luciferase-Aktivität auf $192,38 \pm 13,77$ % ($p = 0,00006$) bzw. $179,55 \pm 9,32$ % ($p = 0,00001$). Inkubation der Kontrolle mit 10, 30 und 100 ng/ml IL-1 β führte zu einer verminderten Steigerung der CREB-abhängigen Gentranskription auf $138,39 \pm 13,1$ % ($p = 0,02$), $123,99 \pm 10,91$ % ($p = 0,02$) und $121,27 \pm 9,11$ %.

hängig zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Hemmung der KCl-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription.

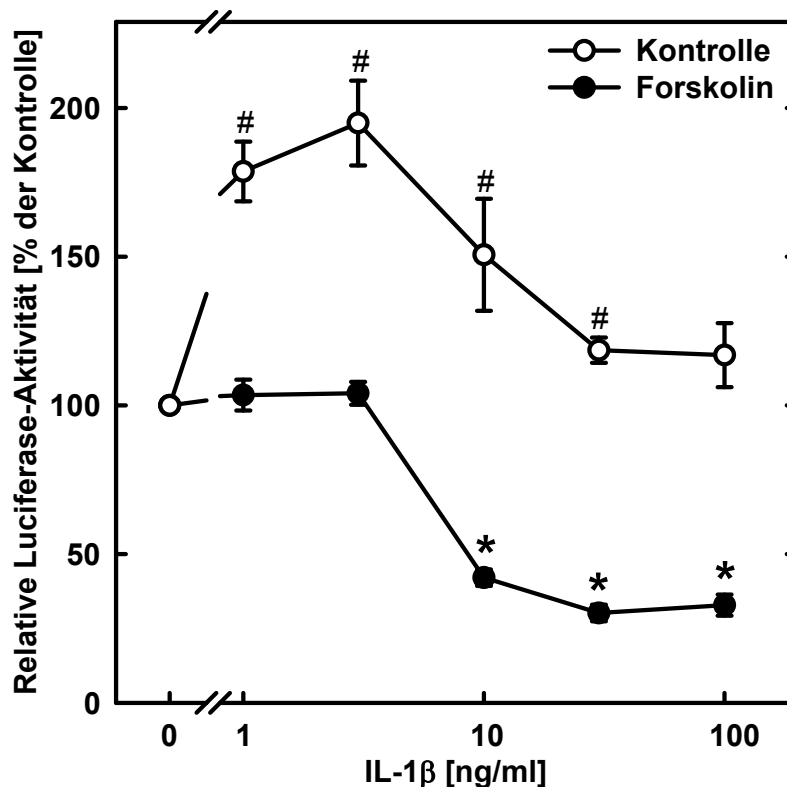


Abb. 3.7 B: Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β auf die durch Forskolin stimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pCRG, 2 μ g pG5E1B und 0,75 μ g pGFP transient transfiziert. Anschließend wurden sie über 24 h mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β (1, 3, 10, 30, 100 ng/ml) und ggf. 6 h vor der Ernte mit 10 mM Forskolin behandelt. Für die Kontrolle (ohne Forskolin) und die mit Forskolin behandelten Werte wurden jeweils die nicht mit IL-1 β behandelten Werte als 100 % definiert, die anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. # p <0,05 bezeichnet den Vergleich der Kontrolle (keine Forskolin-Behandlung) in Abwesenheit von IL-1 β gegenüber ansteigenden Konzentrationen von IL-1 β , * p <0,05 steht für denselben Vergleich in Anwesenheit von Forskolin-Behandlung, ungepaarter Student's t -Test.

Abb. 3.7 B: Die Forskolin-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription wurde durch Inkubation mit 1 und 3 ng/ml IL-1 β kaum gesteigert auf 105,72 \pm 5,11 % bzw. 106,75 \pm 3,84 %. Behandlung mit 10, 30 und 100 ng/ml IL-1 β führte zu einer Reduktion der Forskolin-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription auf 45,26 \pm 2,88 % (p =0,00000002), 32,81 \pm 2,76 % (p =0,000000002) und 35,36 \pm 3,65 % (p =0,00000002). Inkubation der unstimulierten Kontrolle mit 1 und 3 ng/ml IL-1 β führte zu einer Steigerung der relativen Luciferase-Aktivität auf 178,65 \pm 10,01 % (p =0,00002) bzw. 194,94 \pm 14,28 % (p =0,00006). Behandlung der Kontrolle mit 10, 30 und 100 ng/ml IL-1 β führte zu einer verminderten Steigerung der CREB-abhängigen Gentranskription auf 150,67 \pm 18,84 % (p =0,02), 118,57 \pm 4,27 % (p =0,002) und 116,9 \pm 10,77 %. Im Vergleich zur Kontrolle

fürte IL-1 β konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Hemmung der Forskolin-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription.

3.2.6 Die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription

Im Luciferase-Reporter-Gen-Assay sollte untersucht werden, welche Wirkung die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription haben. Die HIT-T15-Zellen wurden mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid p5xGal4E1BLuc (pG5E1B) und dem Expressionsvektor pGAL4-CREBfl (pCRG) transfiziert (s. 3.2). Da keine DLK-Plasmide transfiziert wurden, enthielten die Zellen nur endogene DLK. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert und während der letzten 24 h mit TNF- α oder IL-1 β behandelt.

Abb. 3.8 A zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. Die HIT-T15-Zellen wurden für 24 h mit 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml TNF- α behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Mittelwerte der nicht mit TNF- α behandelten Zellen wurden als 100 % definiert und alle Werte dazu prozentual ausgedrückt. Inkubation mit 1 ng/ml TNF- α reduzierte die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription um 31,79 % auf ein Minimum von $68,21 \pm 6,01$ % ($p=0,005$). Vereinbar mit einem biphasischen Verlauf führte die Behandlung mit 10 ng/ml und 100 ng/ml TNF- α zu einer Steigerung der unstimulierten relativen Luciferase-Aktivität auf $90,82 \pm 7,14$ % bzw. $121,67 \pm 9,37$ %. Einsatz von 300 ng/ml TNF- α führte mit $117,89 \pm 15,11$ % zu keiner weiteren Erhöhung der CREB-abhängigen Gentranskription.

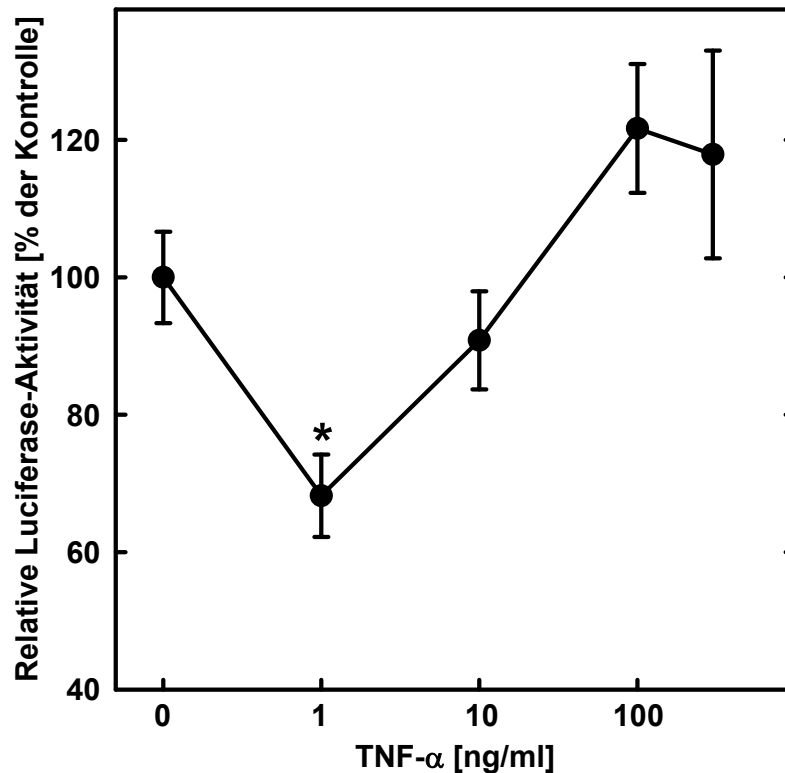


Abb. 3.8 A: Wirkung von TNF- α auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pCRG und 2 μ g pSomCRE pro Mulde transfiziert. Anschließend wurden sie für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (1, 10, 100, 300 ng/ml) behandelt. Die Mittelwerte der nicht mit TNF- α behandelten Zellen entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p < 0.05$ bezeichnet den Vergleich der Kontrolle (keine TNF- α -Behandlung) gegenüber ansteigenden Konzentrationen von TNF- α , ungepaarter Student's *t*-Test.

In Abb. 3.8 B ist der konzentrationsabhängige Effekt von IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription dargestellt. Die Mittelwerte \pm SEM aus sechs in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten wurden abgebildet, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Mittelwerte der nicht mit IL-1 β behandelten Zellen wurden als 100 % definiert und alle Werte dazu prozentual ausgedrückt. Behandlung mit 1 ng/ml und 3 ng/ml IL-1 β erhöhte die unstimulierte relative Luciferase-Aktivität auf $185,51 \pm 8,37$ ($p=0,000000001$) bzw. $187,25 \pm 8,45$ % ($p=0,000000001$). Die Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 β verminderte die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription auf $144,53 \pm 11,1$ % ($p=0,0007$). Der Einsatz von 30 ng/ml IL-1 β senkte die relative Luciferase-Aktivität auf $121,28 \pm 5,64$ % ($p=0,002$), Inkubation mit 100 ng/ml IL-1 β führte mit $119,09 \pm 6,76$ % ($p=0,01$) zu keiner weiteren signifikanten verminderten Stimulation. Insgesamt ist ein biphasischer Verlauf zu erkennen.

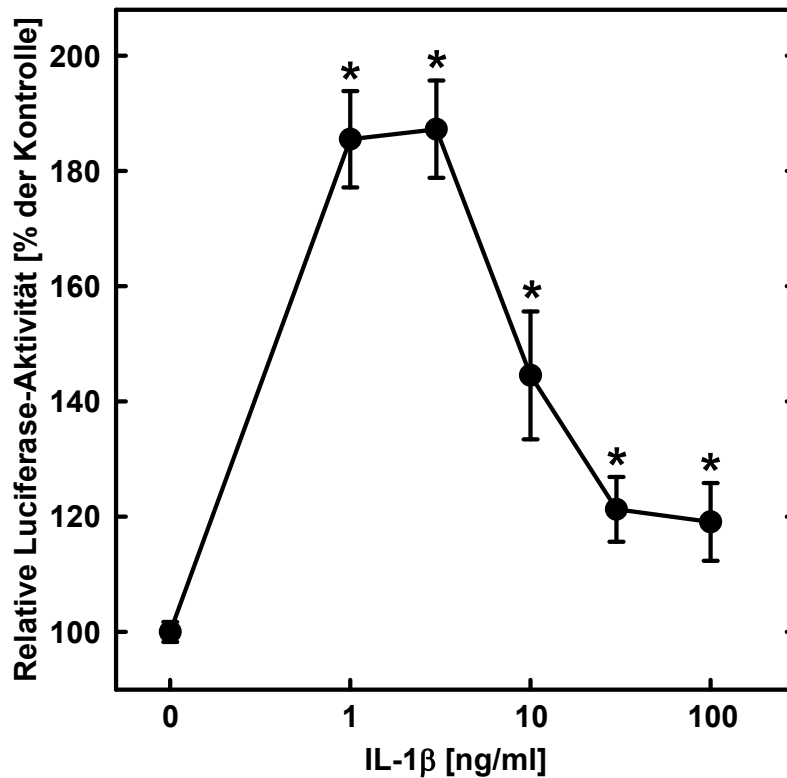


Abb. 3.8 B: Wirkung von IL-1 β auf die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription. Konzentrationswirkungskurve, gemessen im Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g pCRG und 2 μ g pSomCRE pro Mulde transfiziert. Anschließend wurden sie für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β (1, 3, 10, 30, 100 ng/ml) behandelt. Die Mittelwerte der nicht mit IL-1 β behandelten Zellen entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p < 0.05$ bezeichnet den Vergleich der Kontrolle (keine IL-1 β -Behandlung) gegenüber ansteigenden Konzentrationen von IL-1 β , ungepaarter Student's t -Test.

3.3 Der Effekt von siRNA gegen DLK auf die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die CRE-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reportergen-Assay

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt die DLK auf die Wirkung von TNF- α und IL-1 β hat. Dazu wurde siRNA gegen Wildtyp-DLK eingesetzt. Gegen ein spezifisches Protein, hier gegen die DLK, gerichtete small interference-RNA (siRNA) führte zu einer Degradation der mRNA dieses Zielgens in der Zelle (s. 2.3.4). Durch den Einsatz von siRNA gegen Wildtyp-DLK konnte ein Teil der Translation von DLK verhindert werden. Wie in vorausgehenden Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, führte siRNA gegen DLKwt zu einer Verminderung der endogenen DLK um ca. 50 %. Somit konnte die Wirkung der DLK in Zellen mit vermindertem DLK-Gehalt im Vergleich zu Zellen mit normalem DLK-Gehalt untersucht werden.

Es wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt und die Aktivität der exprimierten Luciferase im Luminometer quantifiziert (s. 2.7.2). Die HIT-T15-Zellen wurden entweder mit siRNA Nr. 23 gegen DLK (Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase) oder als Negativkontrolle mit unspezifischer siRNA mit der METAFECTENETM-Methode transfiziert (s. 2.3.4). Alle Zellen wurden zusätzlich mit dem Luciferase-Reportergen-Plasmid p4xSomCRET81Luc (pSomCRE) (s. 3.2) und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mit dem Reportergen-Plasmid pGFP kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h inkubiert, während der 24 h vor der Ernte mit 10 ng/ml TNF- α oder 10 ng/ml IL-1 β behandelt und ggf. 6 h vor der Ernte mit 40 mM KCl oder 10 μ M Forskolin stimuliert. In jeder Abbildung wurden die Mittelwerte \pm SEM aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten dargestellt. Die relative Luciferase-Aktivität von KCl- oder Forskolin-stimulierten Zellen ohne TNF- α - oder IL-1 β -Inkubation entsprach jeweils 100 %, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt.

So konnte im siRNA-Luciferase-Assay der Effekt der Verminderung von endogener DLK auf die Wirkung von TNF- α oder IL-1 β auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription untersucht werden.

3.3.1 Die Wirkung der Verminderung endogener DLK durch siRNA auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von TNF- α

In Abb. 3.9 A wurde die Wirkung von TNF- α in Anwesenheit von unspezifischer siRNA oder siRNA gegen DLK auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription verglichen. Die KCl-stimulierte relative Luciferase-Aktivität ohne TNF- α -Inkubation betrug das 4,5-Fache der unstimulierten relativen Luciferase-Aktivität. Diese KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription ohne TNF- α -Inkubation entsprach 100 %. Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von unspezifischer siRNA, die die endogene DLK nicht verminderte, führte zu einer Reduktion der Gentranskription um 40,75 % auf $59,25 \pm 7,8$ %.

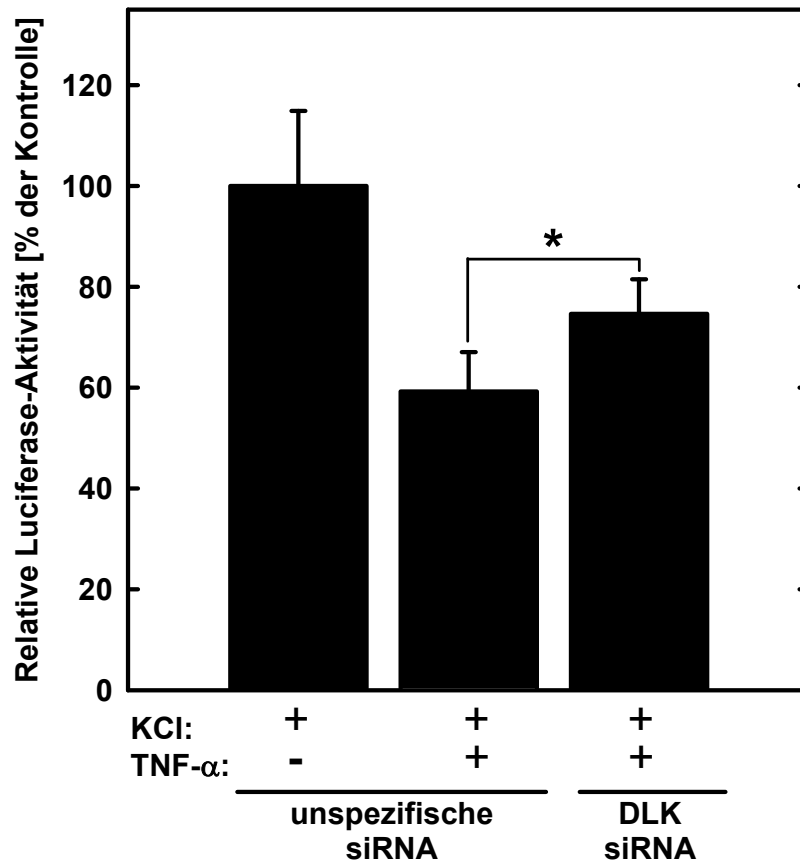


Abb. 3.9 A: Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit TNF- α . Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 60 nM siRNA gegen DLK oder 60 nM unspezifischer siRNA und zusätzlich mit 1 μ g pSomCRE und 0,5 μ g pGFP transfiziert. Anschließend wurden sie ggf. für 24 h mit TNF- α (10 ng/ml) und für 6 h mit 40 mM KCl behandelt. Die Mittelwerte der Zellen mit unspezifischer siRNA-Transfektion, mit KCl-Stimulation ohne TNF- α -Behandlung entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p < 0.05$, gepaarter Student's t -Test.

In Anwesenheit von siRNA gegen DLK, die den Gehalt endogener DLK in den Zellen reduzierte, führte Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α zu einer relativen Luciferase-Aktivität von $74,67 \pm 6,81$ %. Im Vergleich zum Einsatz unspezifischer siRNA konnte Anwesenheit von siRNA gegen DLK die Reduktion der CRE-abhängigen Gentranskription um 15,42 % signifikant vermindern ($p = 0,001$).

Abb. 3.9 B zeigt die durch Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription. Die Wirkung von TNF- α auf die Gentranskription in Zellen, die mit unspezifischer siRNA oder siRNA gegen DLK transfiziert worden waren, wurde verglichen.

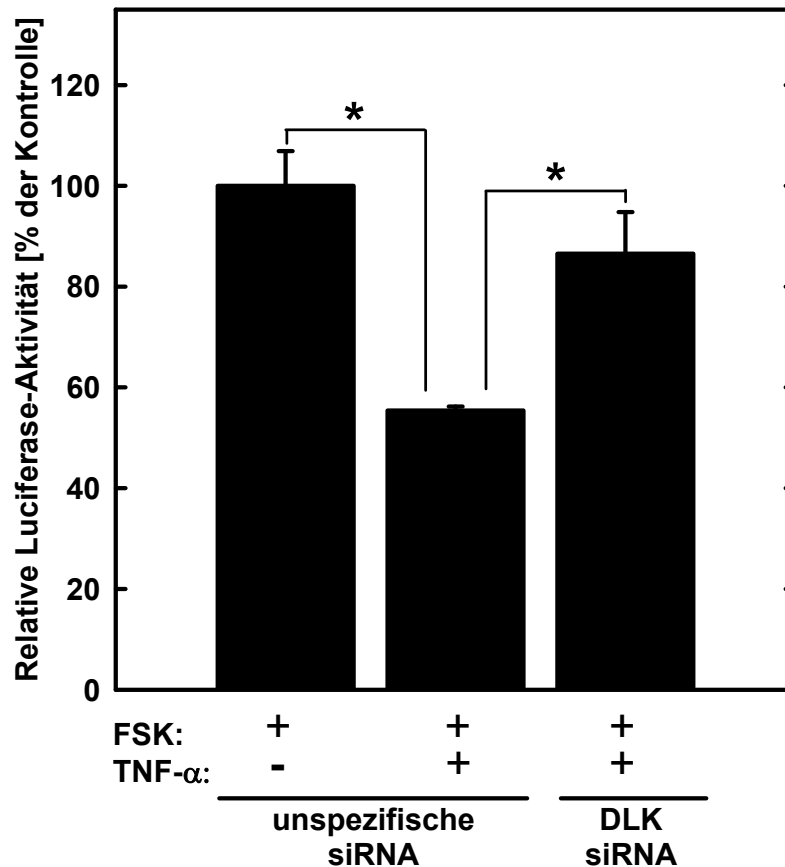


Abb. 3.9 B: Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit TNF- α . Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 60 nM siRNA gegen DLK oder 60 nM unspezifischer siRNA und zusätzlich mit 1 μ g pSomCRE und 0,5 μ g pGFP transfiziert. Anschließend wurden sie ggf. für 24 h mit TNF- α (10 ng/ml) und für 6 h mit 10 μ M Forskolin behandelt. Die Mittelwerte der Zellen mit unspezifischer siRNA-Transfektion, mit Forskolin-Stimulation ohne TNF- α -Behandlung entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p < 0.05$, ungepaarter Student's t -Test.

Die durch Forskolin stimulierte relative Luciferase-Aktivität ohne TNF- α -Inkubation betrug das 57,4-Fache der unstimulierten relativen Luciferase-Aktivität. Diese Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription ohne TNF- α -Inkubation entsprach 100 %. Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von unspezifischer siRNA reduzierte die Forskolin-stimulierte Gentranskription um 44,56 % auf $55,44 \pm 0,76$ % ($p = 0,02$). Behandlung mit TNF- α und Forskolin in Anwesenheit von siRNA gegen DLK führte zu $86,55 \pm 8,25$ % relativer Luciferase-Aktivität, das entsprach mit 31,11 % signifikant weniger Reduktion ($p = 0,002$).

3.3.2 Die Wirkung der Verminderung endogener DLK durch siRNA auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von IL-1 β

In Abb. 3.10 A ist die Wirkung von IL-1 β auf die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von unspezifischer siRNA oder siRNA gegen DLK dargestellt. Die durch KCl stimulierte relative Luciferase-Aktivität ohne IL-1 β -Inkubation betrug das 4,5-Fache der unstimulierten relativen Luciferase-Aktivität. Diese KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription ohne IL-1 β -Inkubation entsprach 100 %. In Anwesenheit von unspezifischer siRNA verminderte Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 β die Calcium-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription um 40,75 % auf $59,25 \pm 11,19$ %. Verminderung der endogenen DLK durch siRNA führte bei Behandlung mit 10 ng/ml IL-1 β und 40mM KCl zu einer Reduktion der Gentranskription auf $78,91 \pm 10,47$ %. Das entspricht 19,66 % weniger Verminderung als bei normalem endogenen DLK-Gehalt.

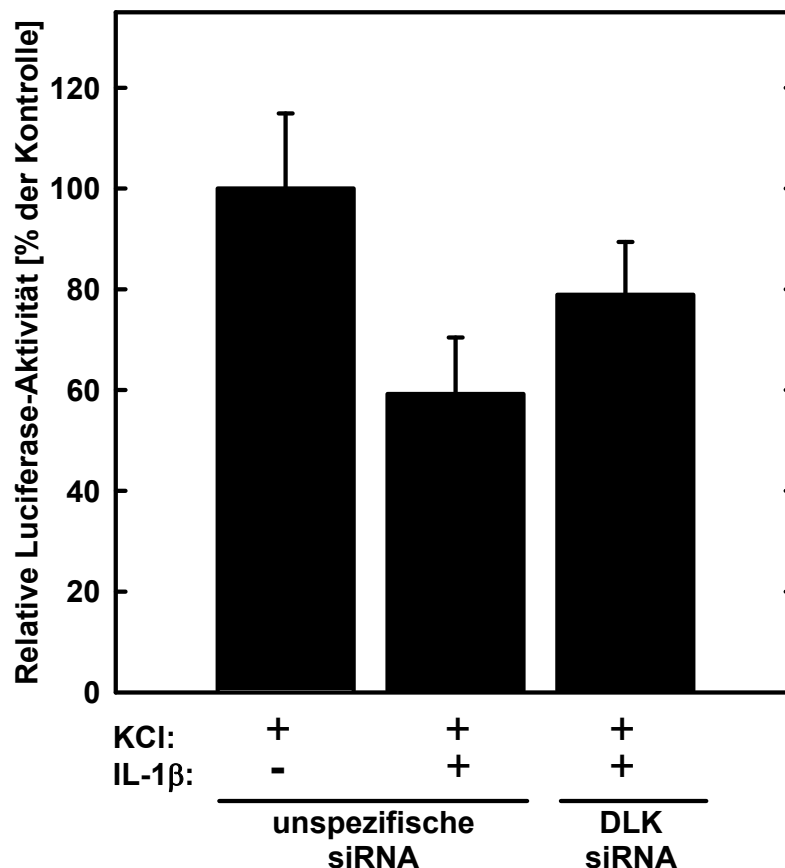


Abb. 3.10 A: Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit IL-1 β . Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 60 nM siRNA gegen DLK oder 60 nM unspezifischer siRNA und zusätzlich mit 1 μ g pSomCRE und 0,5 μ g pGFP transfiziert. Anschließend wurden sie ggf. für 24 h mit IL-1 β (10 ng/ml) und für 6 h mit 40 mM KCl behandelt. Die Mittelwerte der Zellen mit unspezifischer siRNA-Transfektion, mit KCl-Stimulation ohne IL-1 β -Behandlung entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten.

Abb. 3.10 B zeigt die Wirkung von IL-1 β auf die Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von siRNA gegen DLK oder unspezifischer siRNA. Die durch Forskolin stimulierte relative Luciferase-Aktivität ohne TNF- α -Inkubation betrug das 57,4-Fache der unstimulierten relativen Luciferase-Aktivität. Diese Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription ohne TNF- α -Inkubation entsprach 100 %. Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 β und 10 μ M Forskolin in Anwesenheit von unspezifischer siRNA reduzierte die Gentranskription um 48,21 % auf $51,79 \pm 5,16$ % ($p=0,002$). Bei Einsatz von siRNA gegen DLK konnte die Reduktion der Gentranskription durch IL-1 β und Forskolin um 37,6 % auf $89,39 \pm 2,21$ % vermindert werden ($p=0,004$).

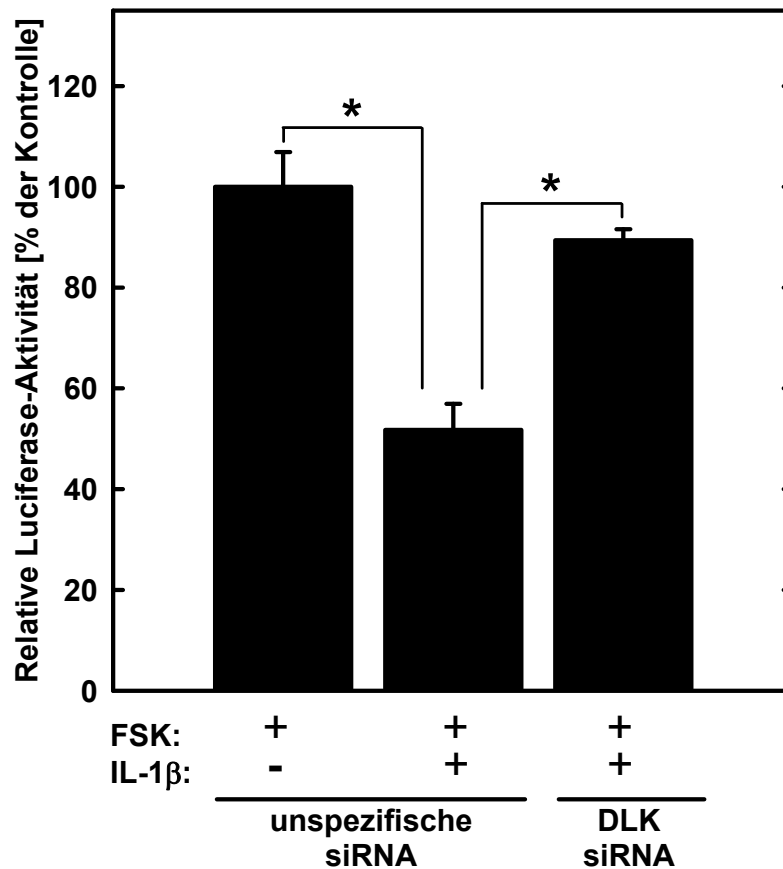


Abb. 3.10 B: Wirkung von verminderter endogener DLK durch siRNA auf die durch Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription bei Inkubation mit IL-1 β . Luciferase-Assay. HIT-T15-Zellen wurden mit 60 nM siRNA gegen DLK oder 60 nM unspezifischer siRNA und zusätzlich mit 1 μ g pSomCRE und 0,5 μ g pGFP transfiziert. Anschließend wurden sie ggf. für 24 h mit IL-1 β (10 ng/ml) und für 6 h mit 10 μ M Forskolin behandelt. Die Mittelwerte der Zellen mit unspezifischer siRNA-Transfektion, mit Forskolin-Stimulation ohne IL-1 β -Behandlung entsprachen 100 %, alle Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. Angegeben wurden die Mittelwerte \pm SEM aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Experimenten. * $p<0.05$, ungepaarter Student's t -Test.

3.4 Der Effekt der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β auf das Überleben der Betazelllinie HIT-T15 im MTT-Vitalitätstest

Es sollte untersucht werden, welchen Effekt diese proinflammatorischen Zytokine auf das Überleben der Betazellen haben. Dazu wurden MTT-Vitalitätstests durchgeführt. Dabei wurde gelbes MTT durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen in blaues Formazan umgesetzt. Die Intensität der Blaufärbung als Maß für die Zellvitalität wurde photometrisch gemessen (s. 2.6.3). Ausplattierte HIT-T15-Zellen wurden für 48 h inkubiert und während dieser Zeit mit den Zytokinen stimuliert. Erst danach wurde das MTT-Reagenz hinzugefügt, so dass es nur durch die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Zellen umgesetzt werden konnte. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, deren Messwerte 100 % überlebenden Zellen entsprachen. Die übrigen Messwerte wurden darauf bezogen. In nur mit Kultur-Medium befüllten Mulden wurde die Hintergrundintensität bestimmt, die von den Messwerten subtrahiert wurde.

3.4.1 Die Wirkung von TNF- α auf das Betazellüberleben

Die Abb. 3.11 A zeigt eine Zeitwirkungskurve, wobei die Zellen mit je 30 ng/ml TNF- α über unterschiedlich lange Inkubationszeiten (6, 12, 24 und 48 h) behandelt wurden. Mit zunehmender Inkubationsdauer führte TNF- α zu einer Abnahme der Überlebensrate der Zellen. Eine Behandlung über 6 h führte zu einer Verringerung der Zellvitalität um ca. 8 % auf $92,06 \pm 1,93$ % ($p=0,008$). Inkubation über 12 h und 24 h führte zu $94,06 \pm 0,86$ % ($p=0,007$) bzw. $92,09 \pm 1,83$ % ($p=0,006$) überlebenden Zellen. Eine 48-stündige Inkubation resultierte in ca. 9 % ($p=0,0004$) Abnahme der überlebenden Zellen auf ein Minimum von $90,92 \pm 1,02$ %.

Abb. 3.11 B zeigt eine Konzentrationswirkungskurve, die Behandlung erfolgte mit 3, 30, 300 und 3000 ng/ml TNF- α über 48 h. Die Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α führte zu einer verminderten Überlebensrate der Zellen. Eine Inkubation mit 3 ng/ml TNF- α verringerte die Zellvitalität um ca. 6 % auf $93,91 \pm 0,95$ % ($p=0,009$), Inkubation mit 30 ng/ml führte zu keiner weiteren Verminderung. Behandlung mit 300 ng/ml bzw. 3000 ng/ml führte zu einer Verringerung der Zellvitalität auf $92,1 \pm 1,97$ % ($p=0,01$) bzw. um 13 % auf ein Minimum von $86,62 \pm 2,04$ % ($p=0,0004$).

Abb. 3.11 A

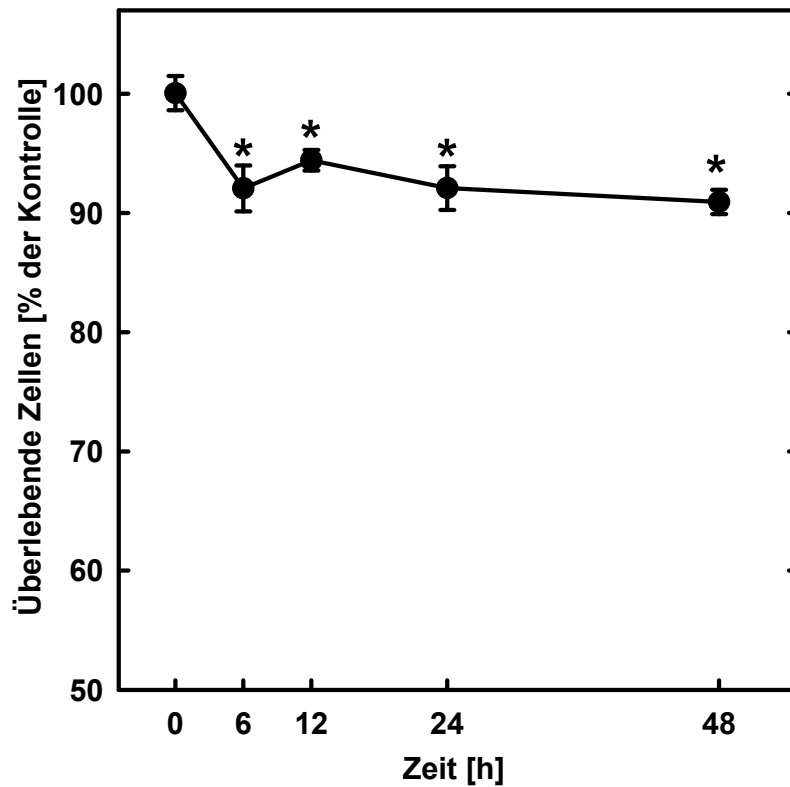


Abb. 3.11 B

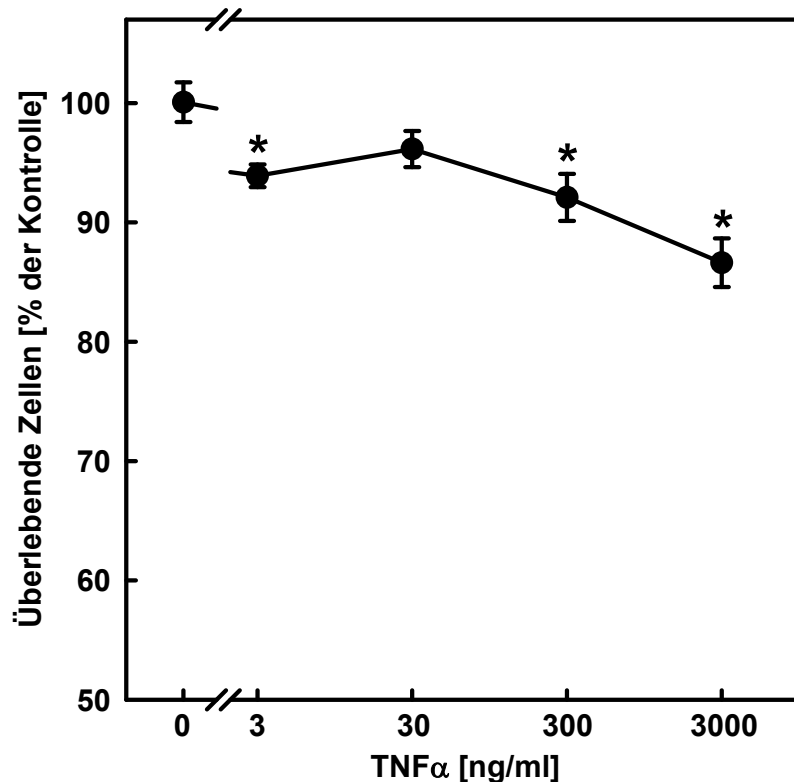


Abb. 3.11 A und B: Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf das Betazellüberleben. **Abb. 3.11 A:** Zeitwirkungskurve im MTT-Vitalitäts-Test. HIT-T15-Zellen wurden je mit 30 ng/ml TNF- α für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h behandelt. **Abb. 3.11 B:** Konzentrationswirkungskurve im MTT-Vitalitäts-Test. HIT-T15-Zellen wurden über 48 h mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α (3, 30, 300, 3000 ng/ml) behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Für jede Abbildung wurde ein Experiment in 6-Fach-Bestimmung durchgeführt, davon sind Mittelwerte \pm SEM angege-

ben. Für beide Abb. entsprachen die Messwerte der unbehandelten Kontrollgruppe 100 % überlebenden Zellen, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. * $p < 0.05$, ungepaarter Student's t -Test.

3.4.2 Die Wirkung von IL-1 β auf das Betazellüberleben

Die Abb. 3.12 A zeigt eine Zeitwirkungskurve. Die Zellen wurden mit je 10 ng/ml IL-1 β über unterschiedlich lange Inkubationszeiten (6, 12, 24 und 48 h) behandelt. Die Inkubation der HIT-T15-Zellen mit 10 ng/ml IL-1 β resultierte in einer Abnahme der Zahl überlebender Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer. 6 h bzw. 12 h lange Inkubation führten zu keiner signifikanten Veränderung der Zellvitalität. Eine 24-stündige Inkubation verringerte die Überlebensrate der Zellen um ca. 4 % auf $95,72 \pm 0,89$ %, eine 48-stündige Inkubation um ca. 24 % auf ein Minimum von $75,88 \pm 0,95$ % ($p = 0,00004$).

Abb. 3.12 B zeigt eine Konzentrationswirkungskurve. Die Behandlung erfolgte mit 0,3 ng/ml, 3 ng/ml, 30 ng/ml und 300 ng/ml IL-1 β über 48 h. Auch die Behandlung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an IL-1 β über 48 h führte zu einer Abnahme der Zahl überlebender Zellen. Eine Inkubation mit 0,3 ng/ml IL-1 β verringerte die Zellvitalität um ca. 5 % ($p = 0,048$). Die Stimulation mit 3 ng/ml führte zu keiner signifikanten Veränderung, doch die Behandlung der Zellen mit 30 ng/ml und 300 ng/ml führte zu einer Verminderung der Zellvitalität um ca. 28 % auf $71,84 \pm 1,43$ % ($p = 0,0000001$) bzw. um 38 % auf $62,29 \pm 0,57$ % ($p = 0,000000001$) auf ein Minimum von $62,29 \pm 0,57$ %.

Abb. 3.12 A

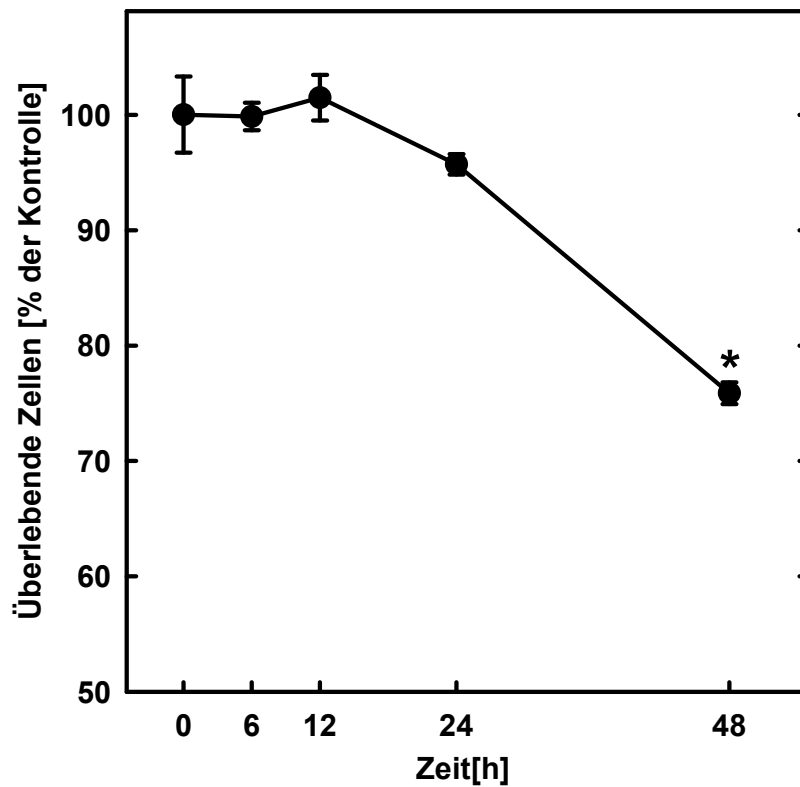


Abb. 3.12 B

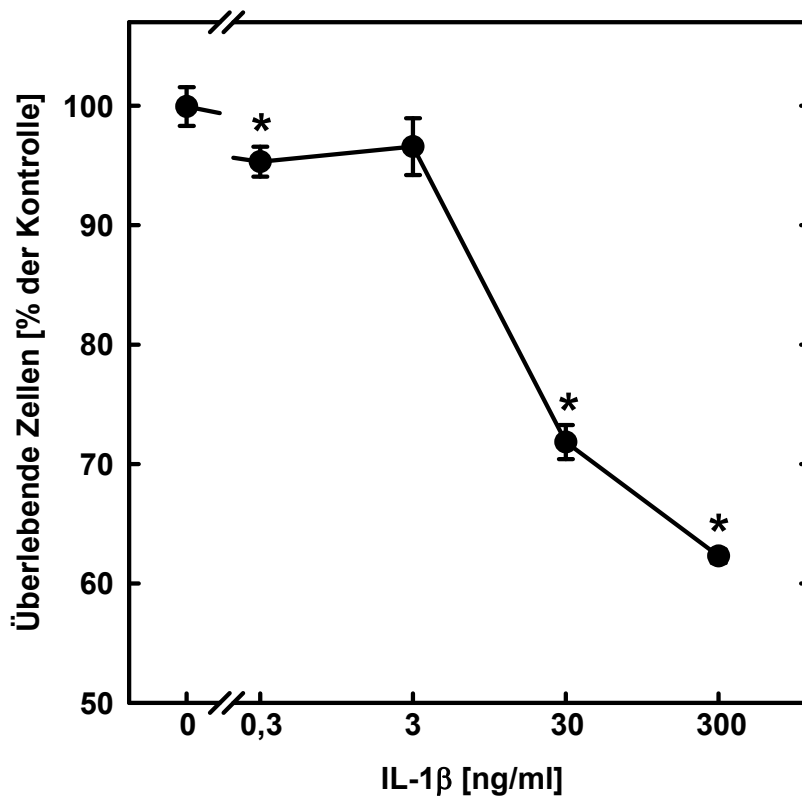


Abb. 3.12 A und B: Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf das Betazellüberleben. **Abb. 3.12 A:** Zeitwirkungskurve im MTT-Vitalitäts-Test. HIT-T15-Zellen wurden je mit 10 ng/ml IL-1 β für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h behandelt. **Abb. 3.12 B:** Konzentrationswirkungskurve im MTT-Vitalitäts-Test. HIT-T15-Zellen wurden über 48 h mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β (0,3, 3, 30, 300 ng/ml) behandelt.

Die Vitalität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Für jede Abbildung wurde ein Experiment in 6-Fach-Bestimmung durchgeführt, davon sind Mittelwerte \pm SEM angegeben. Für beide Abb. entsprachen die Messwerte der unbehandelten Kontrollgruppe 100 % überlebenden Zellen, alle anderen Werte wurden dazu prozentual ausgedrückt. * $p < 0.05$, ungepaarter Student's t -Test.

3.5 Die Wirkung von Cyclosporin A (CsA), TNF- α und IL-1 β auf die Apoptoseinduktion der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 in An- und Abwesenheit von überexprimierter DLK, untersucht im Immunfluoreszenz-Assay

Das häufig in der Transplantationschirurgie eingesetzte Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) hat zahlreiche Nebenwirkungen. Dazu gehört das Entstehen einer Insulinresistenz bis hin zur Manifestation eines Posttransplantationsdiabetes mellitus (Chadban 2008). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β zu einem Zelltod pankreatischer Betazellen führten (s. 3.4). Die Betazellmasse ist in Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 signifikant vermindert, dabei ist die Rate der Betazellapoptose signifikant erhöht (Butler et al. 2003). Deshalb sollte die Induktion des Betazelltodes durch CsA, TNF- α und IL-1 β genauer untersucht werden. Es wurden zwei Arten des Zelltodes unterschieden: Der programmierte Zelltod oder Apoptose und die Nekrose. Um zu untersuchen, ob ein apoptotisches Geschehen vorlag, wurde das Vorhandensein der fragmentierten Caspase-3 als Kennzeichen einer Apoptose untersucht. Dies wurde mit Hilfe eines Doppel-Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt. Um die Apoptose von Betazellen zu untersuchen, wurde ein primärer Antikörper gegen das große Fragment aktivierter Caspase-3 und als sekundärer Antikörper der grün fluoreszierende Alexa-FluorTM-488 Anti-Rabbit-Antikörper eingesetzt. Die Caspase-3 bildete die Endstrecke der Apoptose-Induktion und war nur fragmentiert aktiv (Pop und Salvesen 2009). Der Antikörper erkannte nicht die inaktive Procaspase-3. Um zusätzlich zu untersuchen, welchen Effekt die Kinase-aktive Form der DLK im Vergleich zur Kinase-toten DLK-Mutante K185A allein und in Anwesenheit der Zytokine hatte, wurden ggf. DLK-Wildtyp (DLKwt), die Kinase-tote DLK-Mutante K185A (DLKmut) oder der Leervektor Bluescript (BS) transfiziert. Die überexprimierte DLK war mit einem FLAG-Epitop markiert, an das der Anti-FLAGTM-M2-Monoclonal-Antikörper binden konnte. So konnten Zellen, die positiv für die transfizierte DLK waren, nachgewiesen werden. Als sekundärer Antikörper wurde der rot fluoreszierende Tetramethylrhodamine Anti-Mouse-Antikörper verwendet. In Abb. 3.13 wurden vier typische Bildausschnitte aus einem der unten geschilderten Versuche dargestellt.

	Fluoreszenz	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
apoptische Zellen	grün	fragmentierte Caspase-3	Alexa-Fluor 488
DLK-positive Zellen	rot	anti-FLAG	Tetramethylrhodamine

Tab. 3.2: Übersicht über die eingesetzten Antikörper und die dargestellte Fluoreszenz

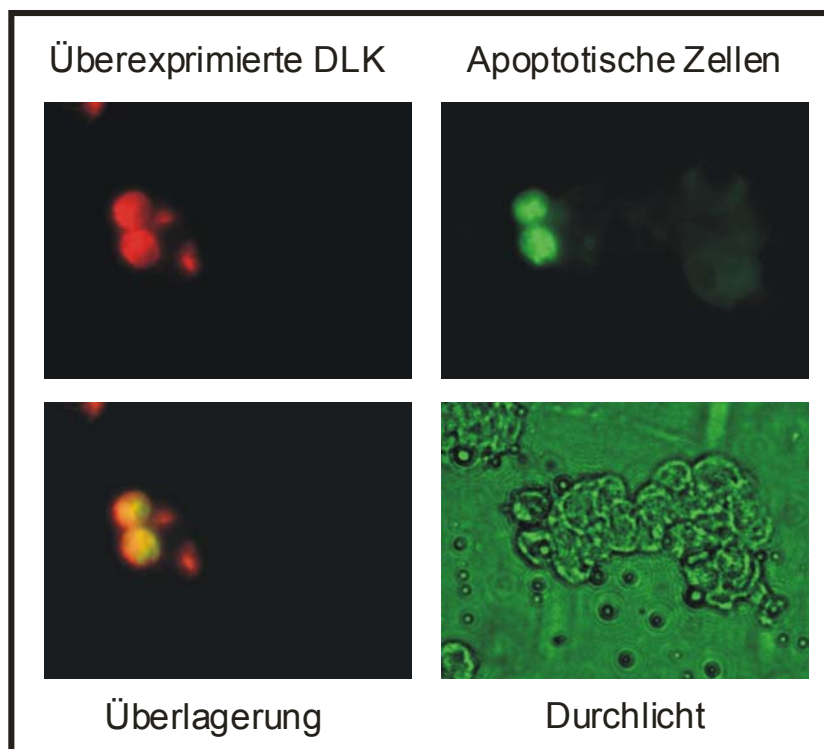


Abb. 3.13: Mikroskopische Bilder von HIT-T15-Zellen im Fluoreszenzlicht und im Durchlicht. Doppel-Immunfluoreszenz-Assay. Beispielhafte Bilder aus einem der unten geschilderten Versuche. HIT-T15-Zellen wurden mittels METAFECTENE™ mit 2 µg DLKwt oder 2 µg BS je Mulde einer 6-well-Platte transfiziert. **Links oben:** Betazellen, die überexprimierte DLK enthielten, wurden in roter Fluoreszenz dargestellt. **Rechts oben:** Apoptotische Betazellen wurden mit Hilfe fragmentierter Caspase-3 in grüner Fluoreszenz dargestellt. **Links unten:** Durch Überlagerung beider Bilder konnte festgestellt werden, ob es sich, wie hier, um dieselben Zellen handelt. **Rechts unten:** Derselbe Bildausschnitt im Durchlicht.

3.5.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von Cyclosporin A auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp

Es sollte die Wirkung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) auf die Induktion einer Betazellapoptose in Abhängigkeit von DLK-Wildtyp untersucht werden. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 µg DLK-Wildtyp oder Bluescript transfiziert. Während der 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit 30 nM oder 300 nM CsA behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte und nur mit Bluescript transfizierte Zellen. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden prozentual zur Gesamtzahl DLK-positiver Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus einem Experiment in Doppelbestimmung.

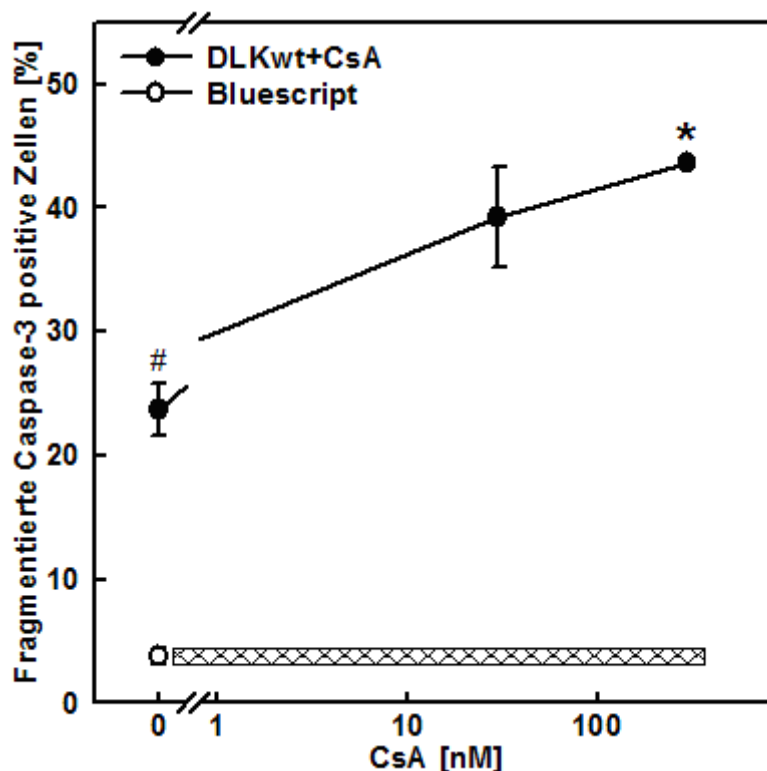


Abb. 3.14: Konzentrationsabhängige Wirkung von Cyclosporin A auf die Betzellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 2 µg DLK-Wildtyp transfiziert und mit ansteigenden Konzentrationen CsA für die Dauer von 48 h behandelt (0, 30, 300 mM). Zur Kontrolle der basalen Apoptoserate dienten nur mit Bluescript behandelte Zellen, siehe schraffierte Fläche. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde prozentual zur Gesamtzahl der DLK-positiven Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus einem Experiment in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 4.200 Zellen ausgezählt. # $p < 0,05$: Vergleich der BS- mit der DLKwt-Transfektion ohne CsA-Behandlung, * $p < 0,05$: Vergleich der Werte ohne CsA-Behandlung mit den Werten, die mit ansteigenden Konzentrationen CsA behandelt wurden (in Anwesenheit von DLKwt), ungepaarter Student's *t*-Test.

Wie in Abb. 3.14 gezeigt, lag die basale Apoptoserate nach Transfektion von Bluescript bei $3,77 \pm 0,6$ % (siehe schraffierte Fläche). Die Transfektion von DLK-Wildtyp erhöhte die Rate Caspase-3-positiver Zellen auf $23,72 \pm 2,1$ % ($p=0,01$). Behandlung mit 30 nM und

300 nM CsA in Anwesenheit von DLKwt steigerte die Apoptoserate weiter auf $39,24 \pm 4,09$ % bzw. $43,62 \pm 0,38$ % ($p=0,01$).

3.5.2 Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von TNF- α auf das Betazellüberleben

Es sollte die Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von TNF- α auf die Betazellapoptose verglichen werden. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde ausgewertet. Die HIT-T15-Zellen wurden mit Bluescript, DLKwt oder DLKmut transfiziert. Je transfizierter Gruppe wurden die Zellen mit 30 ng/ml TNF- α für 48 h behandelt oder nicht mit TNF- α behandelt. Die Zellen wurden mit den oben genannten Antikörpern angefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Es wurden die für DLKwt oder DLKmut positiven Zellen, die zusätzlich für fragmentierte Caspase-3 positiv waren, ausgezählt und als Prozent aller DLK-positiven Zellen ausgedrückt, um die Wirkung der DLK auf die Betazellapoptose zu untersuchen. Bei den mit Bluescript transfizierten Zellen wurden die Caspase-3-positiven Zellen als Prozent von allen Zellen ausgedrückt, um die basale Apoptoserate zu bestimmen.

Abb. 3.15: Die basale Apoptoserate betrug $1,68 \pm 0,13$ %. Behandlung mit 30 ng/ml TNF- α steigerte die Apoptoserate signifikant auf $7,04 \pm 0,25$ % ($p=0,000000003$). Durch Überexpression von DLK-Wildtyp wurde die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen um das 28,71-Fache auf $48,24 \pm 4,17$ % im Vergleich zu nur mit Bluescript transfizierten Zellen erhöht. Überexpression von DLKwt zusammen mit TNF- α -Behandlung führte zu $61,83 \pm 3,54$ % apoptotischer Zellen ($p=0,03$). Überexpression der DLK-Mutante K185A dagegen führte nur zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen um das 2,61-Fache auf $4,38 \pm 1,23$ %. Diese Apoptoserate konnte durch Behandlung mit TNF- α in Anwesenheit von DLKmut nicht gesteigert werden ($4,93 \pm 1,26$ %).

Insgesamt führte die Anwesenheit von DLK-Wildtyp und TNF- α in Betazellen zu einer um 6,55% überadditiven Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu nur mit DLKwt transfizierten oder nur mit TNF- α stimulierten Zellen.

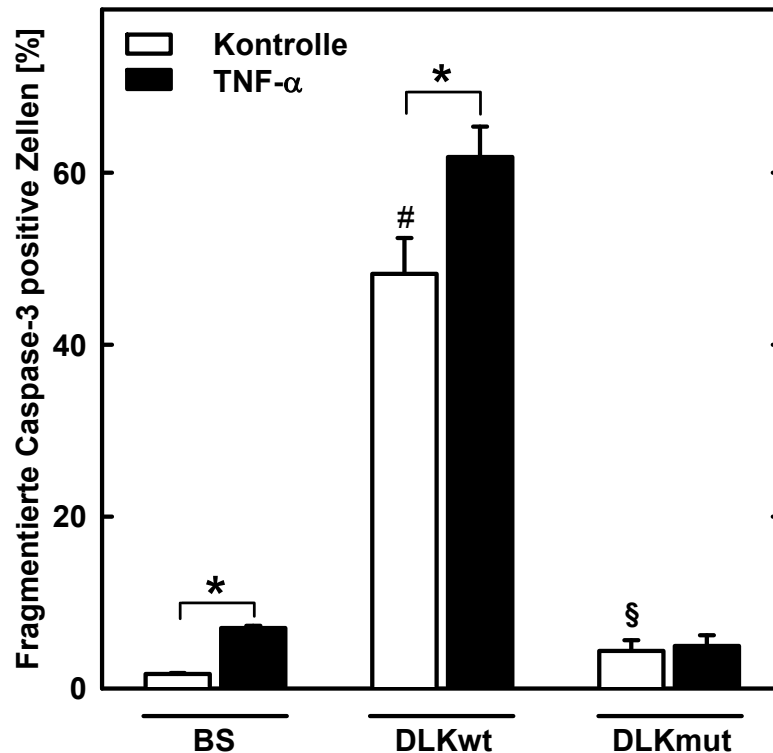


Abb. 3.15: Wirkung von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von TNF- α auf die Betazellapoptose. Immunfluoreszenz-Assay. Mit 2 μ g/Mulde BS, DLKwt oder DLKmut transient transfizierte Zellen wurden wie angegeben mit 30 ng/ml TNF- α behandelt. Die Anzahl der für die fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde innerhalb der DLK-positiven Zellen bzw. zur Gesamtzahl der ausgezählten Zellen dargestellt (s. 2.8.4). Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ Vergleich zwischen BS- und DLKwt-Transfektion, § $p < 0.05$ Vergleich zwischen DLKwt- und DLKmut-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

3.5.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von TNF- α auf die Betazellapoptose in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp

Abb. 3.16 A stellt die konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die Apoptose-Induktion in pankreatischen Betazellen dar. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml TNF- α für 48 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden prozentual zur Gesamtzahl ausgezählter Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten. In Abwesenheit von TNF- α betrug die basale Apoptoserate $2,62 \pm 0,2$ %. Bei Inkubation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml TNF- α stieg die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen auf $4,67 \pm 0,28$ % ($p = 0,0001$) bzw. $7,35 \pm 0,32$ % ($p = 0,00008$). Behandlung mit 1000 ng/ml TNF- α führte zu einer linearen Erhöhung der apoptotischen Zellen auf maximal $10 \pm 0,71$ % ($p = 0,006$).

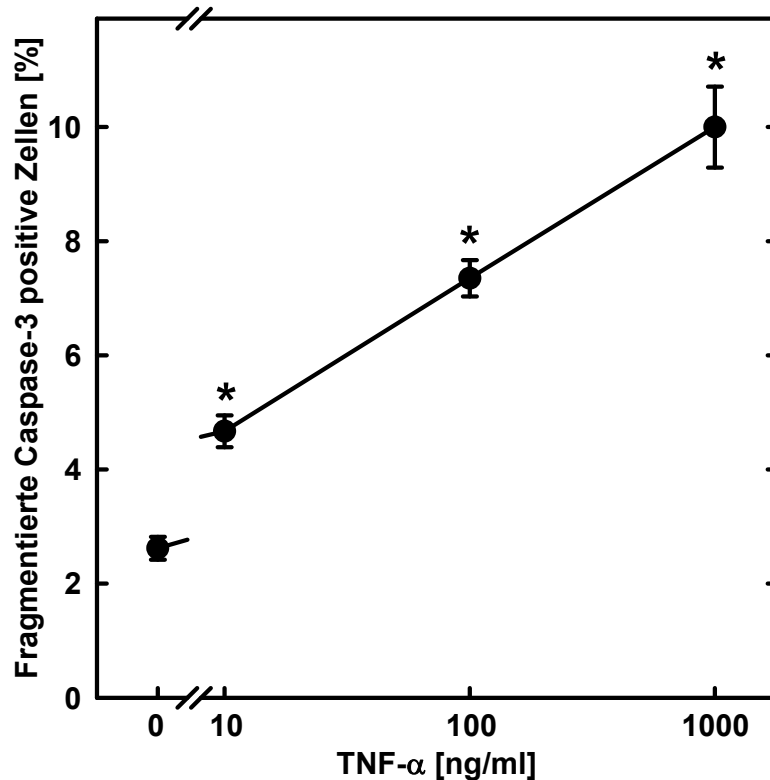


Abb. 3.16 A: Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α für die Dauer von 48 h behandelt (0, 10, 100, 1000 ng/ml). Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 ausgezählt. Vergleich der Werte ohne TNF- α -Behandlung mit den Werten, die mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α behandelt wurden im ungepaarten Student's *t*-Test (* $p < 0.05$).

Abb. 3.16 B stellt die konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α in Anwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose dar. HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g DLKwt oder Bluescript transfiziert und mit 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 300 ng/ml TNF- α für 48 h inkubiert. Nur mit Bluescript transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden prozentual zur Gesamtzahl DLK-positiver Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten. Die basale Rate apoptotischer Zellen in mit BS transfizierten Zellen betrug $2,09 \pm 0,12$ %. Überexpression von DLKwt führte zu einer Steigerung der Apoptoserate auf $32,68 \pm 1,87$ % ($p = 0,00000002$). Inkubation mit 1 ng/ml und 10 ng/ml TNF- α zusätzlich zur Anwesenheit von DLKwt erhöhte die Anzahl apoptotischer Zellen auf $46,22 \pm 1,48$ % ($p = 0,0002$) bzw. $54,23 \pm 1,23$ % ($p = 0,000002$). In Anwesenheit von 100 ng/ml TNF- α wurde die Apoptoserate in DLKwt-positiven Zellen nicht weiter gesteigert. Behandlung mit 300 ng/ml TNF- α in Anwesenheit von DLKwt führte mit $39,43 \pm 2,6$ % sogar zu weniger apoptotischen Betazellen.

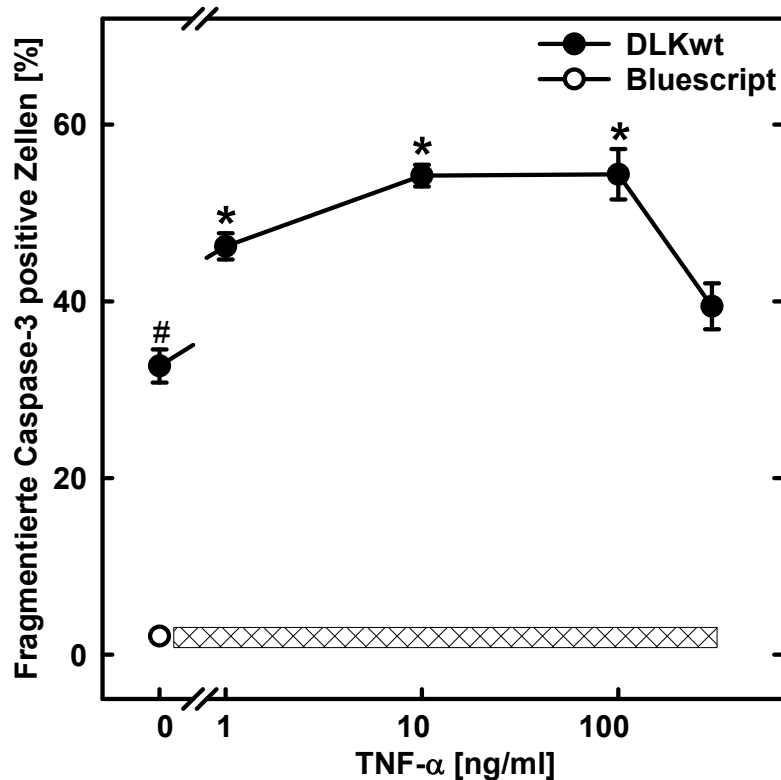


Abb. 3.16 B: Konzentrationsabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g DLK-Wildtyp transfiziert und mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α für die Dauer von 48 h behandelt (0, 1, 10, 100, 300 ng/ml). Zur Kontrolle der basalen Apoptoserate dienten nur mit Bluescript behandelte Zellen, siehe schraffierte Fläche. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde prozentual zur Gesamtzahl der DLK-positiven Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p < 0.05$: Vergleich der Werte ohne TNF- α -Behandlung mit den Werten, die mit ansteigenden Konzentrationen TNF- α behandelt wurden (in Anwesenheit von DLKwt), # $p < 0,05$: Vergleich der BS- und mit DLKwt-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

3.5.4 Zeitabhängiger Effekt von TNF- α auf die Betazellapoptose in An- und Abwesenheit von DLK

Abb. 3.17 A stellt die zeitabhängige Wirkung von TNF- α auf die Apoptose-Induktion in HIT-T15-Zellen dar. In einer Zeitwirkungskurve wurden die Zellen für 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h mit 30 ng/ml TNF- α inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden als Prozent der Gesamtzahl ausgezählter Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten. Unbehandelt lag die Rate Caspase-3-positiver Zellen bei $1,72 \pm 0,1$ %. Durch Inkubation für 6 h und 12 h stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen auf $3,40 \pm 0,15$ % ($p = 0,000003$) bzw. $5,19 \pm 0,18$ % ($p = 0,00000001$). Auch die Behandlung über 24 h und 48 h mit TNF- α erhöhte die Apoptoserate weiter auf $7,1 \pm 0,14$ % ($p = 0,0000000001$) bzw. maximal $8,1 \pm 0,29$ % ($p = 0,000000001$).

Abb. 3.17 B zeigt die zeitabhängige Wirkung von DLK-Wildtyp und TNF- α . Die mit DLKwt transfizierten Zellen wurden für ansteigende Inkubationszeiten (6, 12, 24, und 48 h) mit 30 ng/ml TNF- α behandelt. Zellen, die nicht mit TNF- α behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Die apoptotischen Zellen wurden in Prozent der Gesamtzahl DLK-transfizierter Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Zur Bestimmung der basalen Apoptoserate wurden Zellen nur mit dem Leervektor Bluescript transfiziert (siehe die schraffierte Fläche in der Abbildung). Die basale Apoptoserate betrug $2,37 \pm 0,19$ %. Allein durch die Überexpression von DLKwt erhöhte sich die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen auf $43,69 \pm 2,45$ % ($p=0,000000001$). Inkubation mit TNF- α über 6 h und 12 h steigerte die Anzahl apoptotischer Zellen auf $55,84 \pm 2,14$ % ($p=0,00007$) bzw. $59,8 \pm 1,48$ % ($p=0,000002$). Auch eine Stimulation mit TNF- α über 24 h und 48 h erhöhte die Apoptoserate auf $69,3 \pm 2,2$ % ($p=0,00000009$) bzw. $76,99 \pm 3,4$ % ($p=0,00000008$).

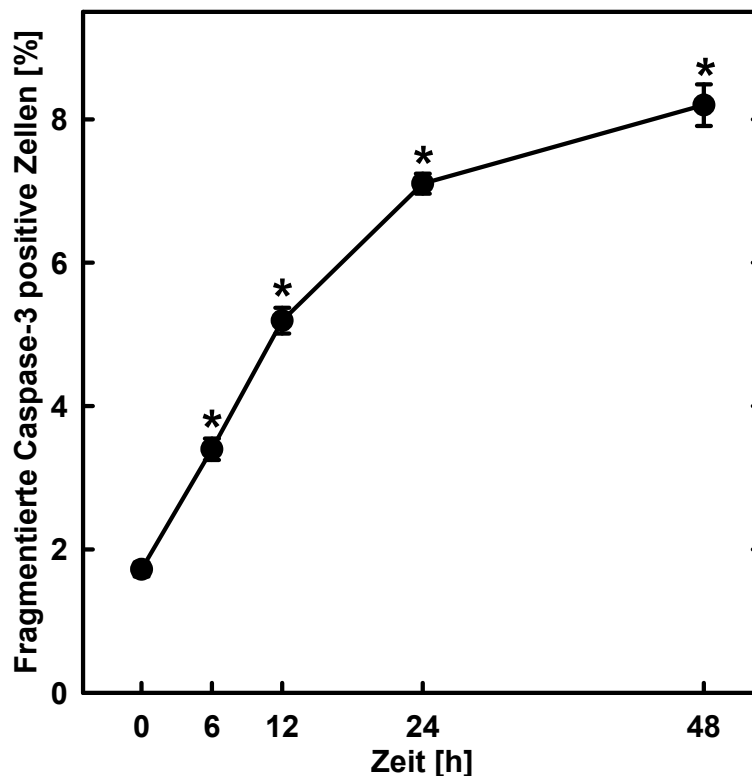


Abb. 3.17 A: Zeitabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden über ansteigende Inkubationszeiten (6, 12, 24, 48 h) mit 30 ng/ml TNF- α behandelt. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. Vergleich der Werte ohne TNF- α -Behandlung mit den Werten, die über ansteigende Inkubationszeiten mit TNF- α behandelt wurden, im ungepaarten Student's t -Test (* $p < 0.05$).

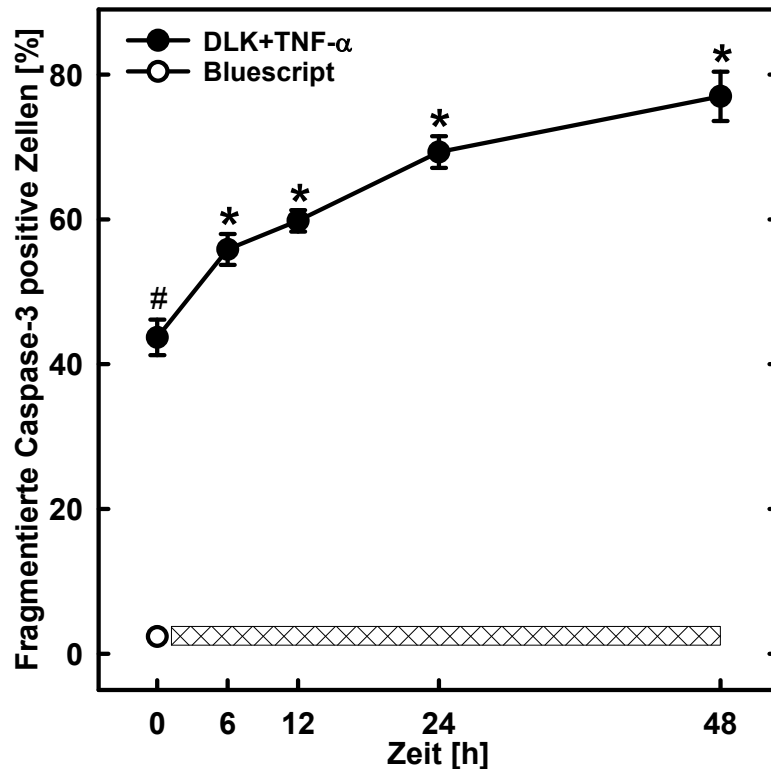


Abb. 3.17 B: Zeitabhängige Wirkung von TNF- α auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g DLKwt oder Bluescript transfiziert und über ansteigende Inkubationszeiten (6, 12, 24, 48 h) mit 30 ng/ml TNF- α behandelt. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung dargestellt. Pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p < 0.05$: Vergleich der Werte ohne TNF- α -Behandlung mit den Werten, die über ansteigende Inkubationszeiten mit TNF- α behandelt wurden (in Anwesenheit von DLKwt), # $p < 0,05$: Vergleich der BS- und mit DLKwt-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

3.5.5 Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von IL-1 β auf das Betazellüberleben

Die Wirkung von DLK-Wildtyp und der Kinase-toten DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von IL-1 β sollte verglichen werden. Im Immunfluoreszenz-Assay wurde die Anzahl apoptotischer Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen bestimmt. Die HIT-T15-Zellen wurden mit DLKwt, DLKmut oder mit dem Leervektor Bluescript transfiziert. Je Gruppe wurden die Zellen einer Mulde mit 10 ng/ml IL-1 β für 48 h behandelt, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die apoptotischen Zellen wurden mit einem Antikörper gegen fragmentierte Caspase-3 und transfizierte DLK enthaltende Zellen mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop der DLK dargestellt. Caspase-3-positive Zellen wurden als Prozent der Gesamtzahl DLK transfizierter Zellen bzw. als Prozent der Gesamtzahl ausgezählter Zellen abgebildet. Wie in Abb. 3.18 dargestellt, erhöhte DLK-Wildtyp die

Anzahl Caspase-3-positiver Zellen um das 13,31-Fache auf $20,63 \pm 2,04$ % im Vergleich zu nur mit BS behandelten Zellen. Die Kinase-tote DLK-Mutante K185A dagegen führte nur zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen um das 2,24-Fache auf $3,47 \pm 0,86$ %. Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 β in Anwesenheit von BS und DLKmut führte zu einer Zunahme Caspase-3-positiver Zellen um das 3,1-Fache auf $4,81 \pm 0,32$ % ($p=0,000002$) bzw. um das 3,2-Fache auf $11,06 \pm 0,45$ % ($p=0,00001$). Die Anwesenheit von DLK-Wildtyp und IL-1 β in Betazellen führte zu einer deutlich überadditiven Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu nur mit DLKwt transfizierten oder nur mit IL-1 β stimulierten Zellen um 22,47 % auf $48,18 \pm 2,77$ % ($p=0,00001$).

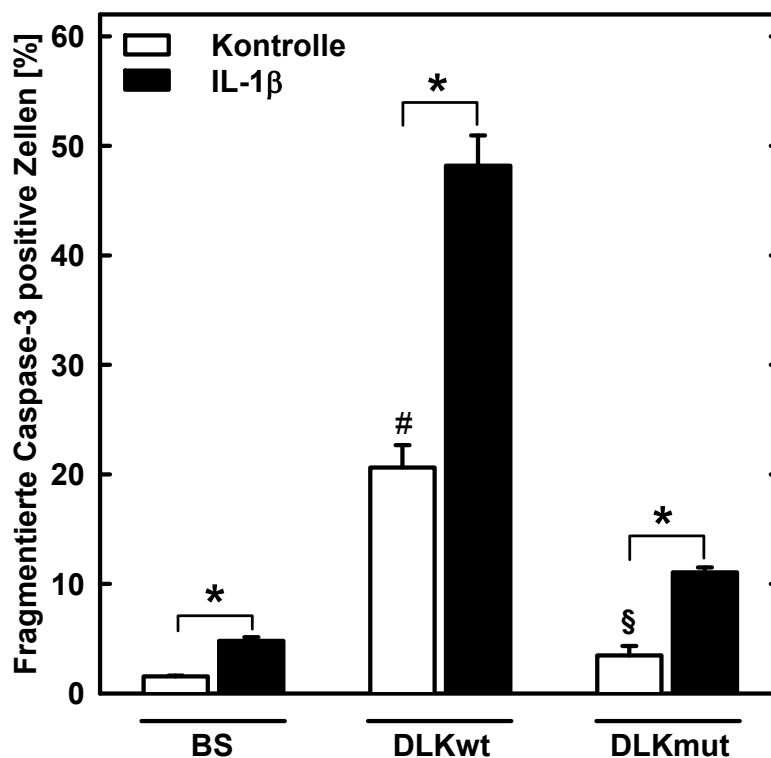


Abb. 3.18: Wirkung von DLK-Wildtyp und DLK-Mutante K185A in An- und Abwesenheit von IL-1 β auf die Betazellapoptose. Immunfluoreszenz-Assay. Mit 2 μ g/Mulde BS, DLKwt oder DLKmut transfizierte Zellen wurden wie angegeben mit 10 ng/ml IL-1 β behandelt. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen ist in Relation zur Gesamtzahl der DLK-positiven Zellen bzw. zur Gesamtzahl der ausgezählten Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p<0.05$, # $p<0.05$ Vergleich zwischen BS- und DLKwt-Transfektion, § $p<0.05$ Vergleich zwischen DLKwt- und DLKmut-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

3.5.6 Konzentrationsabhängiger Effekt von IL-1 β in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose

Abb. 3.19 A zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose. HIT-T15-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β für 48 h behandelt (1, 3, 10, 30, 100 und 300 ng/ml). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden prozentual zur Gesamtzahl ausgezählter Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten dargestellt.

Ohne IL-1 β -Inkubation betrug die basale Apoptoserate $1,44 \pm 0,09$ %. Bei Behandlung mit 1 ng/ml und 3 ng/ml IL-1 β stieg die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen auf $2,72 \pm 0,0,2$ % ($p=0,000006$) bzw. $3,54 \pm 0,29$ % ($p=0,0000002$). Auch die Behandlung mit 10 ng/ml oder 30 ng/ml IL-1 β führte zu einer weiteren Steigerung auf $5,47 \pm 0,3$ % ($p=0,0000000001$) bzw. $7,42 \pm 0,63$ % ($p=0,0000000005$). Inkubation mit höheren Konzentrationen an IL-1 β (100 ng/ml und 300 ng/ml) konnten keine weitere Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen hervorrufen.

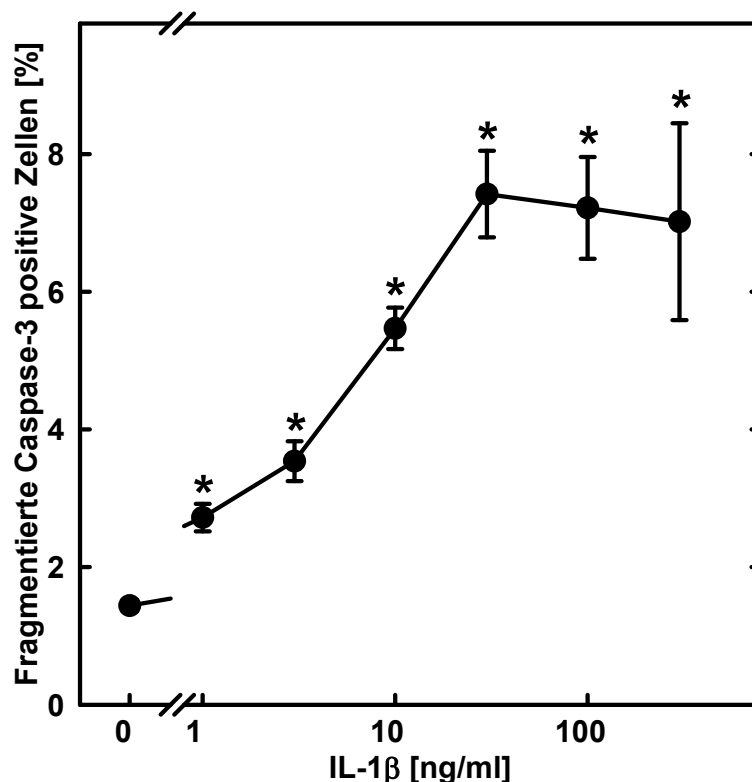


Abb. 3.19 A: Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β für 48 h behandelt (1, 3, 10, 30, 100, 300 ng/ml). Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung abgebildet, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. Vergleich der Werte ohne IL-1 β -Behandlung mit den Werten, die mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β behandelt wurden im ungepaarten Student's *t*-Test (* $p < 0.05$).

Abb. 3.19 B stellt die konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β in Anwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose dar. Mit 2 μ g DLKwt oder Bluescript transfizierte Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β für 48 h behandelt (0,3, 3, 10 und 30 ng/ml). Nur mit Bluescript transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden in Relation zur Gesamtzahl DLK-positiver Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten dargestellt. Die basale Rate apoptotischer Zellen in mit Bluescript transfizierten Zellen betrug $1,65 \pm 0,14$ %. Überexpression von DLKwt führte zu einer Steigerung der Apoptoserate auf $36,37 \pm 2,2$ % ($p=0,00000002$). Inkubation mit 0,3 ng/ml und 3 ng/ml IL-1 β zusätzlich zur Anwesenheit von DLKwt erhöhte die Anzahl apoptotischer Zellen auf $43,46 \pm 2,73$ % bzw. $49,72 \pm 5,94$ % ($p=0,00001$). Auch die Behandlung mit 10 ng/ml und 30 ng/ml IL-1 β in DLKwt-positiven Zellen konnte die Rate fragmentierter Caspase-3-positiver Zellen mit $53,65 \pm 2,65$ % ($0,000000003$) und $64,18 \pm 4,39$ % ($p=0,000000006$) noch weiterhin steigern.

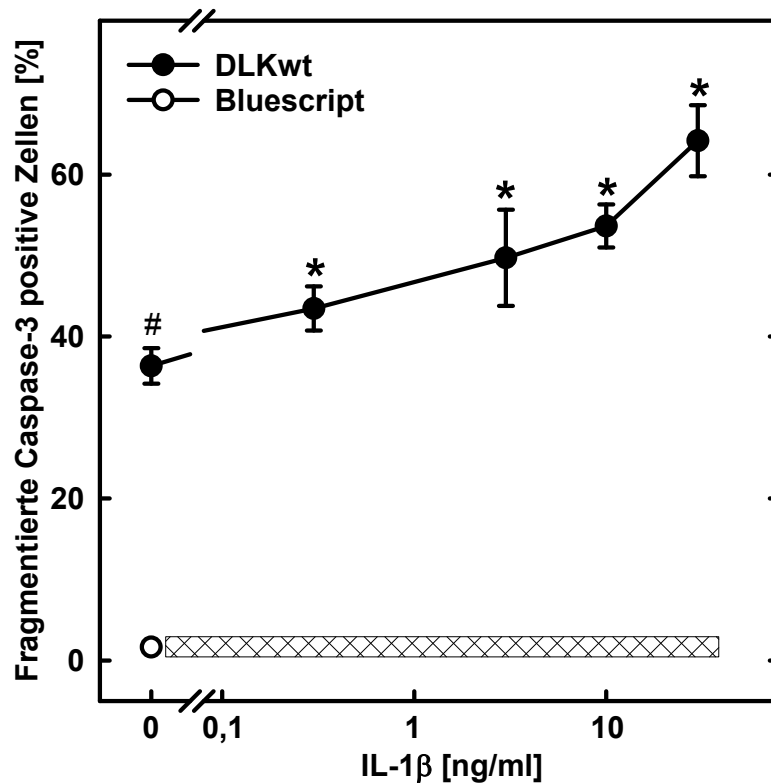


Abb. 3.19 B: Konzentrationsabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g DLK-Wildtyp transfiziert und mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β für die Dauer von 48 h behandelt (0,3, 3, 10 und 30 ng/ml). Zur Kontrolle der basalen Apoptoserate dienten nur mit Bluescript behandelte Zellen, siehe schraffierte Fläche. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurde prozentual zur Gesamtzahl der DLK-positiven Zellen dargestellt. Abgebildet wurden Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p<0,05$: Vergleich der Werte ohne IL-1 β -Behandlung mit den Werten, die mit ansteigenden Konzentrationen IL-1 β behandelt wurden (in Anwesenheit von DLKwt), # $p<0,05$: Vergleich der BS- und mit DLKwt-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

3.5.7 Zeitabhängiger Effekt von IL-1 β in An- und Abwesenheit von DLK-Wildtyp auf die Betazellapoptose

Abb. 3.20 A zeigt die zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose. In einer Zeitwirkungskurve wurden die Zellen für 12 h, 24 h, 48 h oder 72 h mit 10 ng/ml IL-1 β inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Caspase-3-positiven Zellen wurden prozentual zur Gesamtzahl ausgezählter Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten dargestellt. Unbehandelt lag die Rate apoptotischer Zellen bei $1,47 \pm 0,19$ %. Durch Inkubation über 12 h und 24 h stieg die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen auf $3,16 \pm 0,53$ % ($p=0,02$) bzw. $5,36 \pm 0,45$ % ($p=0,00004$). Auch die Behandlung über 48 h mit IL-1 β erhöhte die Apoptoserate weiter auf $7,83 \pm 1,05$ % ($p=0,0004$). Bei einer Inkubationszeit von 72 h sank die Anzahl apoptotischer Zellen leicht auf $5,74 \pm 0,91$ % ($p=0,002$).

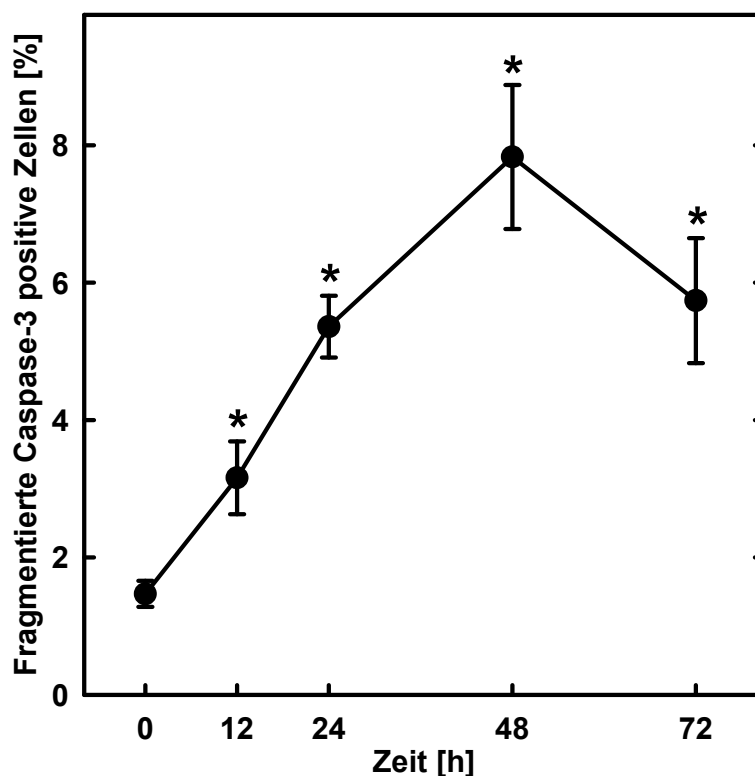


Abb. 3.20 A: Zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betazellapoptose.

Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden über ansteigende Inkubationszeiten (12, 24, 48, 72 h) mit 10 ng/ml IL-1 β behandelt. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen wurden in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung dargestellt, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. Vergleich der Werte ohne IL-1 β -Behandlung mit den Werten, die über ansteigende Inkubationszeiten mit IL-1 β behandelt wurden, im ungepaarten Student's t -Test (* $p<0,05$).

In Abb. 3.20 B ist die zeitabhängige Wirkung von DLK-Wildtyp und IL-1 β dargestellt. Die mit DLKwt transfizierten Zellen wurden für ansteigende Inkubationszeiten (6, 12, 24, und 48 h) mit 10 ng/ml IL-1 β behandelt. Zellen, die nicht mit IL-1 β behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Die apoptotischen Zellen sind als Relation zur Gesamtzahl DLK-transfizierter Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Zur Bestimmung der basalen Apoptoserate wurden Zellen nur mit dem Leervektor Bluescript transfiziert (siehe die schraffierte Fläche in der Abbildung). Die basale Apoptoserate betrug $1,41 \pm 0,12$ %. Überexpression von DLKwt allein erhöhte die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen auf $28,64 \pm 2,18$ % ($p=0,0000002$). Inkubation mit IL-1 β über 6 h und 12 h steigerte die Anzahl apoptotischer Zellen auf $34,61 \pm 1,28$ % ($p=0,04$) bzw. $47,12 \pm 3,32$ % ($p=0,0009$). Auch eine Stimulation mit IL-1 β über 24 h und 48 h erhöhte die Apoptoserate auf $53,92 \pm 5,95$ % ($p=0,002$) bzw. $61,38 \pm 2,13$ % ($p=0,0000008$).

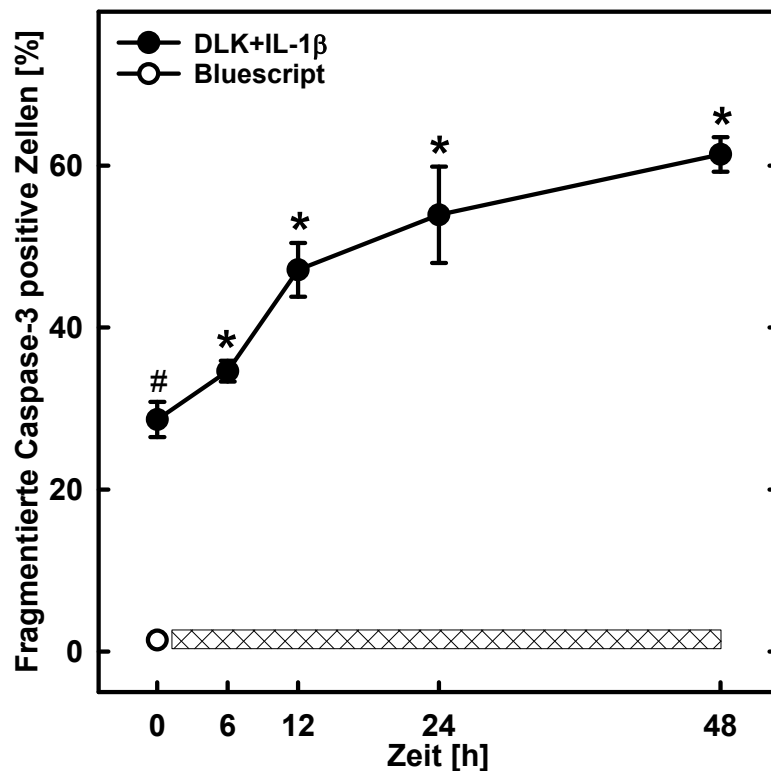


Abb. 3.20 B: Zeitabhängige Wirkung von IL-1 β auf die Betzellapoptose in Anwesenheit von DLK-Wildtyp. Immunfluoreszenz-Assay. Die HIT-T15-Zellen wurden mit 2 μ g DLKwt oder Bluescript transient transfiziert und über ansteigende Inkubationszeiten (6, 12, 24, 48 h) mit 10 ng/ml IL-1 β behandelt. Die Anzahl der für fragmentierte Caspase-3 positiven Zellen ist in Prozent der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen als Mittelwerte \pm SEM aus drei Experimenten in Doppelbestimmung dargestellt, pro Messpunkt wurden ca. 12.600 Zellen ausgezählt. * $p < 0,05$: Vergleich der Werte ohne IL-1 β -Behandlung mit den Werten, die über ansteigende Inkubationszeiten mit IL-1 β behandelt wurden (in Anwesenheit von DLKwt), # $p < 0,05$: Vergleich der BS- und mit DLKwt-Transfektion, ungepaarter Student's t -Test.

4. Diskussion

Die Inzidenz von Adipositas und Diabetes mellitus ist stark zunehmend (Stumvoll et al. 2005, Rathman et al. 2013). Zunehmende Adipositas führt zu einer Insulinresistenz peripherer Gewebe mit chronischer Hyperglykämie. Kompensatorisch entsteht eine Hypertrophie der pankreatischen Betazellen mit folgender Hyperinsulinämie. Eine entsprechende genetische Prädisposition, kombiniert mit anhaltenden negativen Umweltfaktoren, kann schließlich zu einer Dekompensation der Betazellen führen. Es entsteht ein manifester Diabetes mellitus (Rhodes 2005). Diabetes Typ 1 und 2 gemeinsam ist ein Verlust an Funktion, vor allem der Insulinsekretion und Masse der Insulin-produzierenden Betazellen, der zum Ausbruch der Krankheit führt. Trotz der unterschiedlichen Ätiologie beider Diabetesformen scheinen auf molekularer Ebene ähnliche Signaltransduktionswege zu einer Betazellschädigung zu führen (Mandrup-Poulsen 2003).

Sowohl bei Typ 1- als auch bei Typ 2-Diabetes wird die funktionsfähige Betazellmasse durch den Mechanismus der Apoptose reduziert. Ein vielversprechender Gegenspieler dieser Apoptose ist der ubiquitär exprimierte betazellprotektive Transkriptionsfaktor CREB. CREB reguliert die wichtigste Funktion der Betazellen, die Insulingentranskription, und kann Betazellen vor einer Apoptoseinduktion schützen (Jambal et al. 2003, Jhala et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A zum Entstehen eines Posttransplantationsdiabetes beiträgt (Oetjen et al. 2005, Plaumann et al. 2008). Die Regulierung der transkriptionellen Aktivität von CREB könnte ein wesentlicher Punkt im Entstehen von Diabetes mellitus sein, CREB-hemmende Stimuli könnten das Gleichgewicht pro- und antiapoptotischer Signale verschieben. Die MAP3K DLK kann die CREB-abhängige Gentranskription hemmen und zur Schädigung der Betazellen beitragen (Oetjen et al. 2006, Phu et al. 2011). Als MAP3K ist die DLK eine übergeordnete Kinase, die unter anderem die MAPK JNK aktiviert. JNK reguliert die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose von Zellen. Durch eine Signalvermittlung über DLK und JNK kann in Neuronen und auch in Betazellen eine Apoptose induziert werden (Xu et al. 2001, Oetjen et al. 2006, Plaumann et al. 2008).

Bei beiden Diabetesformen zählt die vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ zu den betazellschädigenden Mechanismen. Durch eine Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit Makrophagen werden im Diabetes mellitus Typ 1 $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ produziert. Bei Diabetes mellitus Typ 2 wird $\text{IL-1}\beta$ bei Hyperglykämie von Betazellen und $\text{TNF-}\alpha$ bei Adipositas von Adipozyten sowie von Makrophagen vermehrt freigesetzt (Hotamisligil et al. 1993, Maedler et al. 2002, Donath et al. 2003, Mandrup-

Poulsen 2003). Über Aktivierung von JNK könnten TNF- α und IL-1 β auch auf die DLK und damit die CREB-abhängige Gentranskription einwirken (Ammendrup et al. 2000, Donath et al. 2003, Abdelli et al. 2007).

In dieser Arbeit wurde daher die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die CREB-abhängige Gentranskription und das Betazellüberleben untersucht und zudem, ob diese Wirkung DLK-abhängig ist.

4.1 HIT-T15-Zellen sind ein geeignetes Modellsystem

Zur Untersuchung der Wirkung von TNF- α und IL-1 β in Zusammenhang mit der DLK auf das Betazellüberleben wurde die Zelllinie HIT-T-15 für alle Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet. Um in diesem In vitro-System Funktion und Überleben pankreatischer Betazellen untersuchen zu können, ist es wichtig, dass die HIT-T15-Zellen in ihren Eigenschaften Betazellen aus primären humanen Langerhans'schen Inseln stark ähneln.

Santerre et al. beschrieben 1981 erstmals die von ihnen entwickelte klonale pankreatische Betazelllinie HIT-T15. Durch Transformation von pankreatischen Inselzellen des Syrischen Goldhamsters mit dem Simian-Virus 40 entstand eine Insulin-produzierende permanente Betazelllinie. HIT-T15-Zellen formen in Kultur aneinanderhaftende Multilayer, womit sie Langerhans'schen Inseln morphologisch ähneln. Des Weiteren besitzen sie membrangebundene sekretorische Granula und produzieren Proinsulin und Insulin. Insulin aus HIT-T15-Zellen hat einen identisch Blutglukose senkenden Effekt wie ein Insulin-Standard aus dem Schwein. Obwohl das in den HIT-T15-Zellen produzierte Insulin funktionell mit Schweineinsulin identisch ist, wird insgesamt in der permanenten Zelllinie weniger Insulin als im Ursprungsgewebe produziert. Zusätzlich variiert der Insulingehalt zwischen verschiedenen Passagen und wird mit zunehmendem Passagealter weniger (Santerre et al. 1981, Ashcroft et al. 1986). Daher wurden in allen Experimenten Zellen ähnlicher und relativ früher Passagen (35 - 70) verwendet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. HIT-T15-Zellen sind wie Neuronen elektrisch erregbar und besitzen gut charakterisierte spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle (Keahey et al. 1989, Cook et al. 1991, Thomas und Pek 1992). Glukose ist der wichtigste physiologische Regulator der Insulingentranskription und -sekretion. Glukose wird in die Betazellen aufgenommen und metabolisiert, dabei entsteht ATP, es kommt zu einer Schließung ATP-sensitiver K⁺-Kanäle. Die daraus folgende Membrandepolarisation führt zum Calciumeinstrom über spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle und Insulin wird per Exozytose aus Speichergranula sezerniert (Cook et al. 1991). Dieser Mechanismus der Insulinsekretion ist auch in HIT-T15-Zellen nachweisbar. Die Insulinsekretion kann wie in humanen Betazellen durch Glukose stimuliert und durch Somatostatin und Dexamethason gehemmt wer-

den (Santerre et al. 1981). Zusätzlich ist die Insulinsekretion wie bei humanen Betazellen abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration (Ashcroft et al. 1986).

Aus pankreatischen Alpha-Zellen stammendes Glukagon sowie das intestinale Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) aus den L-Zellen des Dünndarms verstärken die Insulinsekretion zusätzlich, dies wurde bisher nicht in HIT-T15-Zellen nachgewiesen (Holz und Habener 1992).

Eine etablierte Methode, den Mechanismus der Insulingentranskription und -sekretion experimentell zu stimulieren, stellt die Behandlung der HIT-T15-Zellen mit Kaliumchlorid (KCl) und Forskolin dar (Oetjen et al. 1994, 2003a, 2006, Schwaninger et al. 1995a, b). Eine Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration bewirkt über Membrandepolarisation eine intrazelluläre Calciuserhöhung über die L-Typ-Calciumkanäle (Thomas und Pek 1992). Forskolin führt über Aktivierung der Adenylatcyclase zu vermehrter cAMP-Produktion (Seamon et al. 1981).

Das humane Insulingen enthält vier Kopien der CRE-Sequenz, und CREB kann an den humanen Insulingenpromotor binden. Auch in HIT-T15-Zellen ist die Insulingentranskription abhängig von dem Transkriptionsfaktor CREB. Diese CRE-/CREB-abhängige Gentranskription kann durch den zweiten Botenstoff cAMP sowie durch Membrandepolarisation stimuliert werden und ist ausführlich charakterisiert. Die hemmende Wirkung von CsA auf die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription ist ebenfalls beschrieben (Schwaninger et al. 1993a, b, c, 1995a, b, Eggers et al. 1998, Oetjen et al. 1994, 2003b, 2005, 2006). Des Weiteren konnte in HIT-T15-Zellen gezeigt werden, dass die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase DLK Calcineurin-sensitiv ist und die durch Membrandepolarisation stimulierte CREB-abhängige Gentranskription hemmen kann (Oetjen et al. 2006, Plaumann et al. 2008). Zusätzlich kann eine reproduzierbare Apoptoseinduktion in HIT-T15-Zellen durch spezifische Calcineurin-Inhibitoren festgestellt werden. Dabei wird die Apoptose durch Aktivierung der Caspase-Kaskade ausgelöst, es kann unter anderem eine erhöhte Aktivität von Caspase-3 nachgewiesen werden. (Krautheim et al. 2000, Plaumann et al. 2008).

Weiterhin sind in HIT-T15-Zellen Untersuchungen mit proinflammatorischen Zytokinen durchgeführt worden. Durch TNF- α kann die basale und Glukose-stimulierte Insulinsekretion und die Gentranskription von Proinsulin gehemmt werden (Tsiotra et al. 2001). IL-1 β kann über Induktion der Nitritoxidsynthase die Produktion von NO in HIT-T15-Zellen erhöhen, was zu einer Schädigung der DNA führt (Delaney et al. 1993, Chen et al. 2004). Entsprechende Rezeptoren für die Zytokine, der IL-1R1 und der TNF-R1, werden auf pankreatischen Betazellen exprimiert (Mandrup-Poulsen 2003, Wajant et al. 2003).

Zusammengefasst besitzen HIT-T15-Zellen wichtige Eigenschaften humaner pankreatischer Betazellen. Sie produzieren Insulin, das über den physiologischen Mechanismus

der Membrandepolarisation freigesetzt wird. Die Insulinsekretion und Gentranskription sind durch physiologische Stimuli regulierbar und ebenso wie die Signaltransduktion gut charakterisiert. Auch der in dieser Arbeit untersuchte und für das Betazellüberleben wichtige Transkriptionsfaktor CREB und die CREB-hemmende DLK wurden in HIT-T15-Zellen untersucht. Weitere Vorteile in der Wahl dieser Zelllinie liegen darin begründet, dass sich die Zellen leicht kultivieren und transfizieren lassen. HIT-T15-Zellen weichen aber als Tumorzellen in ihren Eigenschaften betreffend Proliferation, Differenzierung und Apoptoseregulation von normalen Betazellen ab. Zwar besteht auch physiologisch eine Plastizität der Betazellmasse mit Apoptoseinduktion und Umwandlung von bestimmten pankreatischen Gangepithelien zu Betazellen, dies ist aber von dem Mechanismus der Teilung in einer transformierten Zelllinie zu differenzieren (Rhodes 2005). Des Weiteren stammt die Zelllinie HIT-T15 von Betazellen eines Goldhamsters und nicht von humanen Zellen ab, so dass sich die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nur mit Vorsicht übertragen lassen.

Insgesamt stellt die pankreatische Betazelllinie HIT-T15 ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Wirkung von TNF- α und IL-1 β in Zusammenhang mit der DLK auf das Betazellüberleben dar.

4.2 Hemmung der CRE-/CREB-abhängigen Gentranskription durch TNF- α und IL-1 β

Es konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation mit TNF- α oder IL-1 β die stimulierte CRE-/CREB-abhängige Gentranskription gehemmt wird.

Der Transkriptionsfaktor cAMP-responsives-Element (CRE)-bindendes Protein (CREB) ist für Funktion und Überleben von Betazellen wichtig. Die bedarfsgerechte Sekretion von Insulin ist eine Hauptfunktion der Betazellen. CREB aktiviert die stimulierte Insulingentranskription in Betazellen (Oetjen et al. 1994, 2003b). CREB-knockout-Mäuse werden diabetisch und zeigen einen Betazellverlust durch Apoptose (Jhala et al. 2003). Überexpression von CREB in MIN6-Zellen schützt diese vor einer Zytokin-induzierten Apoptose (Jambal et al. 2003). Die CREB-abhängige Gentranskription beeinflusst also sowohl die Funktion als auch das Überleben von Betazellen. CREB wird über Membrandepolarisation, intrazelluläre Calciumerhöhung und Calcium-Calmodulin-abhängige Kinasen sowie über Erhöhung des second Messengers cAMP und die Proteinkinase A phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung rekrutiert CREB als Homodimer die Koaktivatoren CBP und TORC. Der CREB/CBP/TORC-Komplex kann an CRE-Motive in Genen binden und die entsprechende Gentranskription vermitteln (Schwaninger et al. 1993a, c, Oetjen et al. 1994, 2003b).

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β werden bei Typ 1- und Typ 2-Diabetes vermehrt produziert (Hotamisligil et al. 1995, Maedler et al. 2002, Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003). Beide Zytokine tragen zur Verschlechterung von Funktion und Überleben der Betazellen und damit zur Entstehung von Diabetes mellitus bei.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die CRE- und CREB-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Zuerst wurde der Effekt von TNF- α auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Betazellen untersucht. Als Stimuli der CRE-abhängigen Gentranskription dienen KCl zur Imitation der Membrandepolarisation durch Glukose sowie Forskolin als Äquivalent einer cAMP-Erhöhung durch GLP-1.

Wie Abbildung 3.3 zeigt, hemmt TNF- α signifikant die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription um maximal 83 % bei einer Konzentration von 100 ng/ml. Die Hemmung ist konzentrationsabhängig und ab einer Konzentration von 10 ng/ml TNF- α signifikant. In gleicher Konzentration zeigt TNF- α keinen signifikant hemmenden Effekt auf die durch Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription. Anschließend wurde der Effekt von TNF- α auf die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription untersucht (s. 3.2.2). Es wurde die Funktion von transfiziertem CREB ohne Beeinflussung durch endogene CRE-bindende Proteine untersucht. Die TNF- α Wirkung ist ähnlich, ab einer Konzentration von 10 ng/ml zeigt TNF- α eine signifikante Hemmung der KCl-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription um maximal 61%. Auch die CREB-abhängige und durch Forskolin stimulierte Gentranskription wird durch TNF- α nicht signifikant gehemmt, nur die Höchstkonzentration von 300 ng/ml TNF- α zeigt eine leichte signifikante Hemmung (s. Abb. 3.4). Durch TNF- α kann also die KCl-stimulierte CRE- und CREB-abhängige Gentranskription in Betazellen signifikant gehemmt werden, nicht aber die Forskolin-stimulierte Gentranskription.

Die im prädiabetischen Zustand vorliegende Hyperglykämie (Saltiel und Kahn 2001) könnte zu einer vermehrten Aktivierung der CREB-abhängigen Gentranskription, auch der Insulingentranskription, führen (Oetjen et al. 2003a, b). Vermehrt produziertes und in Speichervesikeln vorliegendes Insulin könnte die Glukosehomöostase über einen gewissen Zeitraum stabilisieren. Durch die hier gezeigte TNF- α -vermittelte Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription könnte dieses Gleichgewicht zu Gunsten einer weiteren Dysregulation und Diabetesmanifestation verschoben werden.

Es wurde weiterhin der Effekt von IL-1 β auf die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription untersucht (s. Abb. 3.7 A, B). Durch IL-1 β konnte die KCl-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription in Konzentrationen ab 10 ng/ml IL-1 β signifikant gehemmt werden. Die durch Forskolin stimulierte CREB-abhängige Gentranskription konnte

durch IL-1 β ebenfalls ab einer Konzentration von 1 ng/ml signifikant gehemmt werden. IL-1 β kann also sowohl die KCl- als auch die Forskolin-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription hemmen, während TNF- α nur die KCl-stimulierte Gentranskription hemmen kann. Dies lässt folgern, dass beide Zytokine zu einer Funktionsschädigung der Betazellen über Hemmung der CREB-abhängigen, betazellprotektiven Gentranskription führen. IL-1 β kann aber auch die Forskolin-stimulierte, also über erhöhtes cAMP und aktivierte Proteinkinase A vermittelte Gentranskription hemmen und daher möglicherweise noch über andere Mechanismen zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB und damit einer Betazellschädigung führen als TNF- α .

In der Untersuchung der unstimulierten CREB-abhängigen Gentranskription zeigen TNF- α und IL-1 β ebenfalls eine unterschiedliche Wirkung. Unter unstimulierten Bedingungen hemmt TNF- α in niedrigen Konzentrationen (1 ng/ml) signifikant die CREB-abhängige Gentranskription um ca. 32 % und steigert sie dann in einem biphasisch wirkenden Verlauf ab einer Konzentration von 10 ng/ml (s. Abb. 3.8 A). Durch IL-1 β wird in niedrigen Konzentrationen (1, 3 ng/ml) die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription stark gesteigert um ca. 86 %, in höheren Konzentrationen ab 10 ng/ml dann deutlich geringer gesteigert (s. Abb. 3.8 B).

Der Vergleich des Effekts von TNF- α und IL-1 β auf die unstimulierte und die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription zeigt folgendes: Trotz biphasischem Verlauf mit Hemmung und dann Steigerung der unstimulierten CREB-abhängigen Gentranskription (s. Abb. 3.8 A) führt TNF- α zu einer kontinuierlich konzentrationsabhängig steigerbaren Hemmung der KCl-stimulierten CREB-abhängigen Gentranskription (s. Abb. 3.4). Auch IL-1 β kann die unstimulierte CREB-abhängige Gentranskription deutlich steigern (s. Abb. 3.8 B), in Zusammenhang mit Stimulation durch KCl oder Forskolin führt IL-1 β aber zu einer Hemmung (s. Abb. 3.7 A, B).

Der Transkriptionsfaktor CREB ist in pankreatischen Betazellen wichtig für das Überleben und die Funktion, da es z.B. die Transkription des humanen Insulins reguliert (Jhala et al. 2003, Oetjen et al. 2003b). Die Inkubation mit TNF- α und IL-1 β hemmt die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription und wirkt so schädigend auf die Betazellen. Möglicherweise können die Zytokine in geringen Konzentrationen über Steigerung der sonst unstimulierten CREB-abhängigen Gentranskription eine protektive Gegenregulation in den Betazellen vermitteln. Unter Annahme dieser Theorie könnte die Steigerung der unstimulierten Gentranskription nicht ausreichend sein, den hemmenden Effekt höherer Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β auf die mit KCl bzw. Forskolin stimulierte Gentranskription auszugleichen.

4.3 Verstärkung der TNF- α -vermittelten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch Überexpression von DLK

Die TNF- α -induzierte Hemmung der KCI-stimulierten, CRE-abhängigen Gentranskription wird durch Überexpression von Wildtyp-DLK verstärkt.

Wie oben beschrieben, kann TNF- α die KCI-stimulierte CRE- und CREB-abhängige Gentranskription hemmen. Oetjen et al. zeigten 2006, dass die MAP3-Kinase DLK ebenfalls die KCI-stimulierte CREB-abhängige Gentranskription hemmt. Als MAP3K kann die DLK untergeordnete MAP2K, z.B. MKK 4 und 7 und MAPK, z.B. JNK aktivieren, deren Substrate Transkriptionsfaktoren sind (Nihalani et al. 2003). Sowohl TNF- α als auch IL-1 β können die untergeordnete MAPK JNK aktivieren (Donath et al. 2003). Möglicherweise könnte die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die CREB-abhängige Gentranskription der Betazellen über die DLK als Signalweg vermittelt werden. So könnten über die DLK wichtige Signale für die Funktion und das Überleben von Betazellen vermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde daher im Luciferase-Assay untersucht, welchen Effekt die DLK auf die Wirkung von TNF- α auf die KCI-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription hat (s. 3.2.5). Dazu wurden in die HIT-T15-Zellen Plasmide transfiziert, die zu einer Überexpression von aktiver Wildtyp DLK (DLKwt), Kinase-toter DLK-Mutante K185A (DLKmut) und als Kontrolle dem Leervektor Bluescript (BS) führen.

Zunächst wurde die Wirkung der transfizierten Plasmide auf die unstimulierte Gentranskription verglichen (s. Tabelle 3.1). Durch Überexpression von DLKwt kann die unstimulierte CRE-abhängige Gentranskription gehemmt werden. Dagegen wird durch Überexpression der katalytisch inaktiven DLK-Mutante eine Steigerung der unstimulierten Gentranskription ausgelöst. Diese Steigerung könnte dadurch bedingt sein, dass durch Bildung von Homodimeren mit der Kinase-toten DLK-Mutante auch ein Teil der endogenen DLK nicht aktiviert werden kann. Die hemmende Wirkung der endogenen DLK auf die CRE-abhängige Gentranskription würde so durch Überexpression von DLKmut gehemmt.

Es wurde weiterhin der Effekt von DLKwt und der Kinase-toten DLK-Mutante auf die KCI-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Zusammenhang mit 30 ng/ml TNF- α verglichen (s. Abb. 3.5). Die KCI-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription liegt bei 388 %. Sowohl durch die Überexpression von DLKwt, als auch durch die Inkubation mit TNF- α ohne DLKwt-Überexpression wird die CRE-abhängige Gentranskription auf 131 % bzw. 112 % signifikant gehemmt. Durch Einsatz von TNF- α und DLKwt zusammen wird die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription weiter signifikant verstärkt auf 53 %.

Sowohl TNF- α als auch die DLK können allein die transkriptionelle Aktivität von CRE/CREB hemmen, und scheinen sich gegenseitig in dieser Hemmung zu verstärken.

Die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch TNF- α könnte also über die DLK vermittelt werden.

Trotz Überexpression der inaktiven Mutante DLKmut wird durch TNF- α eine Hemmung der stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription von 220 % auf 56 % vermittelt. Unter der Vorstellung, dass die Wirkung von TNF- α über die DLK vermittelt wird, könnte man erwarten, dass TNF- α in Anwesenheit der Kinase-toten DLKmut zu einer weniger starken Hemmung führen würde. Dies trifft aber bei Überexpression der Kinase-toten Mutante DLKmut nicht zu. In einem weiteren Luciferase-Assay wurde daher die Wirkung von TNF- α auf die KCI-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription in Anwesenheit von Bluescript oder der Kinase-toten DLK-Mutante verglichen (s. Abb. 3.6). TNF- α kann sowohl in Anwesenheit von Bluescript als auch DLKmut konzentrationsabhängig die KCI-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription hemmen. Eine mögliche Erklärung, warum die Wirkung von TNF- α so gering durch die transfizierten Plasmide beeinflusst wird, ist, dass die Transfektion mittels der DEAE-Dextran Methode durchgeführt wurde. In Experimenten der Arbeitsgruppe konnte eine Transfektionseffizienz von 5 % der behandelten Zellen erreicht werden. In den übrigen Zellen könnte noch genug endogene DLK vorhanden sein, um die durch TNF- α induzierte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB zu vermitteln. Wahrscheinlich erscheint, dass die Wirkung von TNF- α auf die CRE-abhängige Gentranskription durch die in den Betazellen verbleibende endogene DLK zusätzlich zu der durch Transfektion überexprimierten DLKwt vermittelt werden kann. Weiterhin könnte die DLK-Mutante bei geringer Transfektionseffizienz auch als Protein nicht ausreichend exprimiert worden sein. Dazu passt, dass einerseits die Wirkung von TNF- α in Kombination mit überexprimierter Wildtyp-DLK stärker ist, als die Wirkung von TNF- α und DLKwt allein, und andererseits die Wirkung durch TNF- α trotz Überexpression von DLKmut nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Überexpression des Leervektors Bluescript ist.

Die Überexpression von aktiver DLKwt und inaktiver DLKmut kann daher nur darauf hinweisen, aber nicht klären, ob die TNF- α -induzierte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB über die DLK, oder über einen zum Teil von der DLK unabhängigen Mechanismus vermittelt wird. Um zu dies weiter zu klären, wurde in den Betazellen zusätzlich die endogene DLK mittels siRNA verringert.

4.4 Beteiligung der DLK an der TNF- α - und IL-1 β -vermittelten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription

Durch den Einsatz von siRNA gegen die DLK konnte die endogene DLK der HIT-T15-Zellen vermindert werden. Durch Verringerung der endogenen DLK kann die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch TNF- α signifikant und durch IL-1 β teilweise signifikant aufgehoben werden.

Es sollte untersucht werden, ob die Wirkung der Zytokine auf die transkriptionelle Aktivität von CREB über die MAP3K/DLK vermittelt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass endogene DLK in HIT-T15-Zellen vorhanden ist. Vorherige Untersuchungen zeigten die Existenz von DLK in HIT-T15-Zellen mittels Immunblot-Analyse und Reverse-Transkriptase-PCR. Zusätzlich konnte die DLK mittels Immunfluoreszenz in primären Inseln der Maus nachgewiesen werden (Oetjen et al. 2006, Plauermann et al. 2008).

In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die DLK in unstimulierten Zellen perinukleär im Zytosol lokalisiert zu sein scheint. Durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β könnte eine vermehrte Translokation der DLK in den Nucleus vermittelt werden (Wallbach 2010). Als Transkriptionsfaktor entfaltet CREB seine Wirkung ebenfalls im Zellkern. Da durch die DLK die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription gehemmt werden kann (Oetjen et al. 2006), könnte die Wirkung der Zytokine auf die CREB-abhängige Gentranskription über die DLK vermittelt werden.

Wie oben beschrieben, kann durch TNF- α und IL-1 β die CREB-abhängige Gentranskription gehemmt werden. Dabei scheint die Überexpression von aktiver DLK die Wirkung von TNF- α zu verstärken. Bei Überexpression einer katalytisch inaktiven Mutante konnte aber keine signifikante Reduktion der durch TNF- α ausgelösten Hemmung auf CREB gezeigt werden.

Ursächlich dafür scheint die geringe Transfektionseffizienz mittels DEAE-Dextran von 5 % zu sein, so dass die TNF- α Wirkung über die verbleibende Menge an endogener DLK vermittelt werden könnte. In Ermangelung eines gewebespezifischen DLK-Inhibitors wurde der Gehalt an endogener DLK durch den Einsatz von siRNA in den HIT-T15-Zellen stärker reduziert. Wie in vorausgehenden Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt der Einsatz von siRNA gegen Wildtyp-DLK zu einer Reduktion der endogenen DLK um ca. 50 %. Doppelsträngige RNA, die über RNA-Interferenz die endogene homologe mRNA vermindert, wurde erstmals 1998 von Fire et al. beschrieben. Künstlich hergestellte Small interference RNA (siRNA) besteht aus 21-23 Basenpaaren doppelsträngiger RNA, deren Basen-Sequenz homolog zu einem Abschnitt der ausgewählten mRNA ist. In eine Zelle transfizierte doppelsträngige siRNA kann an den Antisense-

siRNA-Strang der homologen Sequenz der mRNA des Zielgens binden und diese degradieren. Durch Verminderung der mRNA werden auch die Proteinbiosynthese und damit die Menge des in der Zelle vorliegenden Proteins vermindert. Über den Einsatz von siRNA ist also mittels verminderter Synthese die spezifische Hemmung eines Proteins möglich (Tuschl und Borkhardt 2002, Ozpolat et al. 2010).

Es wurde eine siRNA gegen die Wildtyp-DLK und als Negativkontrolle eine unspezifische nichtkodierende siRNA (non-siRNA) im Luciferase-Assay eingesetzt. Zusätzlich wurde das Luciferase-Reportergen-Plasmid p4xSomCRET81Luc (pSomCRE) transfiziert, an das endogene CRE-bindende Proteine binden können, um zu untersuchen, welche Wirkung die Verminderung endogener DLK auf die Wirkung von TNF- α oder IL-1 β auf die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription hat.

Zunächst wurde der Effekt der DLK auf die TNF- α -vermittelte Wirkung untersucht. In Anwesenheit von unspezifischer siRNA kann durch Inkubation mit 10 ng/ml TNF- α die KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription um 41 % gehemmt werden (s. Abb. 3.9 A). Die Reduktion der endogenen DLK durch siRNA gegen DLK führt zu einer signifikanten Verminderung um 15 % der TNF- α -vermittelten Hemmung der KCl-stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription.

Weiterhin wurde untersucht, ob die DLK an der TNF- α -induzierten Wirkung auf die Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription beteiligt ist (s. Abb. 3.9 B). Durch TNF- α wird auch die Forskolin-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription gehemmt. Einsatz von siRNA gegen DLK führt zu einer um 31 % signifikant reduzierten Hemmung der Forskolin-stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription durch TNF- α .

Das heißt, durch eine Verminderung der endogenen DLK in Betazellen mittels siRNA kann ein signifikanter Teil der TNF- α -vermittelten Hemmung sowohl der durch KCl als auch der durch Forskolin stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription aufgehoben werden. Die durch das Zytokin TNF- α induzierte Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription scheint zu einem signifikanten Teil über die DLK vermittelt zu werden.

Auch der Effekt der DLK auf die Wirkung von IL-1 β wurde untersucht (s. Abb. 3.10 A, B). In Anwesenheit von unspezifischer siRNA führen 10 ng/ml IL-1 β zu einer signifikanten Hemmung der durch KCl und Forskolin stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription um 41 % bzw. 48 %. Eine Reduktion der endogenen DLK durch siRNA hat folgenden Effekt: Die durch IL-1 β vermittelte Hemmung der KCl-stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription wird um 20 % vermindert, ist aber nicht signifikant. Die IL-1 β -induzierte Hemmung der Forskolin-stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription wird signifikant um 37 % vermindert. Durch die Reduktion der endogenen DLK mittels siRNA wird auch die IL-1 β -vermittelte Hemmung der KCl- und Forskolin-stimulierten CRE-abhängigen

Gentranskription zum Teil aufgehoben, dies ist aber nur bei Forskolin signifikant, bei Stimulation der CRE-abhängigen Gentranskription durch KCl nur ein Trend.

Die TNF- α - und IL-1 β -vermittelte Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription kann durch Verminderung des DLK-Gehalts der Betazellen zu einem signifikanten Teil aufgehoben werden. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die Betazellen von der DLK abhängig sein könnte. Dabei ist der Effekt der verminderten DLK auf die durch TNF- α induzierte CREB-Hemmung sowohl nach Stimulation mit KCl als auch mit Forskolin signifikant, auf die durch IL-1 β induzierte CREB-Hemmung nur nach Stimulation mit Forskolin signifikant.

Die durch TNF- α vermittelte CREB-Hemmung scheint also zu einem größeren Anteil über die DLK vermittelt zu sein als die IL-1 β -vermittelte CREB-Hemmung. Da CREB für das Betazellüberleben wichtig ist, könnte nicht nur die Wirkung der Zytokine auf die CREB-abhängige Gentranskription, sondern auch die Wirkung auf den Betazelltod über die DLK vermittelt sein. Interessant ist, in wie weit ein unterschiedlicher Effekt der DLK in der Vermittlung der Wirkung von TNF- α und IL-1 β vorliegt.

4.5 TNF- α - und IL-1 β -induzierter Betazelltod

Bisher wurden die Ergebnisse betreffend der Wirkung der Zytokine TNF- α und IL-1 β auf die Hemmung der CRE-/CREB-abhängigen Gentranskription und damit auf die Betazellfunktion diskutiert. Ob die Krankheit Diabetes mellitus manifest wird, hängt nicht nur von der Funktion, sondern auch von der verbleibenden Betazellmasse ab (Maedler und Donath 2004). Im Folgenden sollen daher die Untersuchungen dieser Arbeit zum Effekt von TNF- α und IL-1 β auf das Überleben bzw. den Tod der Betazellen dargestellt werden.

Mit Hilfe des MTT-Tests konnte der Einfluss von TNF- α und IL-1 β auf die generelle Zellviitalität dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Behandlung mit TNF- α über ansteigende Inkubationszeiten und in ansteigenden Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Betazellmasse führt (s. Abb. 3.11 A, B). Auch durch IL-1 β kann zeit- und konzentrationsabhängig eine signifikante Verminderung der überlebenden Betazellen ausgelöst werden (s. Abb. 3.12 A, B).

Sowohl TNF- α als auch IL-1 β können zeit- und konzentrationsabhängig einen signifikanten Betazelltod induzieren. Dabei führt IL-1 β zu einer stärkeren Reduktion der Betazellmasse als TNF- α . Durch TNF- α wird die Zellviitalität dagegen schon früher signifikant vermindert als durch IL-1 β . IL-1 β reduziert die Betazellmasse also stärker, zeigt diesen Effekt aber erst nach längerer Inkubation als TNF- α . Dies könnte daraufhin deuten, dass

TNF- α und IL-1 β unterschiedlich stark oder zum Teil über unterschiedliche Mechanismen auf die Betazellen wirken könnten.

4.6 Wirkung der DLK auf die Cyclosporin A-vermittelte Betazellapoptose

Über die DLK wird eine Betazellapoptose induziert, die durch Cyclosporin A verstärkt werden kann. Die DLK könnte daher für unterschiedliche Stimuli, z.B. auch für proinflammatorische Zytokine, eine zentrale Rolle in der Apoptoseinduktion von Betazellen einnehmen.

Bei Einsatz des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) nach Organtransplantationen kann als Nebenwirkung ein Posttransplantationsdiabetes auftreten. Dieser beruht auf einer verminderten Insulinsekretion und Apoptose von Betazellen (Penforis und Kury-Paulin 2006, Vincenti et al. 2007). Es gibt Anzeichen, dass die CsA-induzierte Betazellschädigung DLK-abhängig ist (Plaumann et al. 2008).

In der dieser Dissertation vorausgehenden Arbeit in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CsA die enzymatische Aktivität der DLK stimuliert und CsA bei Anwesenheit der DLK eine erhöhte Apoptose von Betazellen auslöst (Plaumann 2007, Plaumann et al. 2008). Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit die Wirkung verschiedener Konzentrationen CsA bei Überexpression der DLK auf die Apoptose von Betazellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch Überexpression von DLK erhöhte Betazellapoptoserate durch CsA konzentrationsabhängig signifikant erhöht wird (s. Abb. 3.14).

Die schädigende Wirkung von CsA auf die Betazellen scheint also auch über die DLK vermittelt zu werden. CsA wirkt über Hemmung der Phosphatase Calcineurin (Schreiber und Crabtree 1992) und kann die betazellprotektive stimulierte CRE-abhängige Gentranskription hemmen (Oetjen et al. 2003b). Auch die MAP3-Kinase DLK kann die CREB-abhängige Gentranskription hemmen (Oetjen et al. 2006). Die DLK ist aktiv in ihrer Form als phosphoryliertes Homodimer und wird durch Dephosphorylierung inaktiviert. Durch Calcineurin scheint die DLK dephosphoryliert zu werden (Mata et al. 1996, Oetjen et al. 2006).

Die in Abb. 3.14 gezeigte Verstärkung der DLK-Wirkung durch CsA könnte also durch eine Calcineurin-Hemmung und dadurch verminderte Dephosphorylierung und verminderte Inaktivierung der DLK vermittelt sein. So läge mehr aktive DLK vor, die unter anderem über Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription zu einer Betazellapoptose beitragen könnte. Obwohl CsA zu einem Posttransplantationsdiabetes führen kann, könnte

der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch verstärkte DLK-Wirkung als konvergierender Signalweg für verschiedene Mediatoren auch wichtig für das Entstehen von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 sein. Daher wurde unabhängig vom Posttransplantationsdiabetes die Wirkung der DLK in Zusammenhang mit den bei Diabetes mellitus Typ 1 und 2 erhöhten proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β auf die Betazellapoptose untersucht.

4.7 Wirkung von TNF- α und IL-1 β in Abhängigkeit von der DLK auf die Betazellapoptose

Durch TNF- α und IL-1 β kann jeweils eine signifikante Betazellapoptose ausgelöst werden. Überexpression der DLK verstärkt die TNF- α - und IL-1 β -vermittelte Betazellapoptose in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität. Die TNF- α -vermittelte Betazellapoptose wird dabei zu einem größeren Teil über die DLK vermittelt als die IL-1 β -induzierte Apoptose.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch TNF- α und IL-1 β ein signifikanter Betazelltod ausgelöst werden kann, die Form des Betazelltodes im MTT-Vitalitätstest ist aber unspezifisch (s. 4.6). Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 sind durch eine spezifische Form des Zelltodes, die Apoptose, gekennzeichnet. Bei Typ 2-Diabetikern ist die Apoptoserate der Betazellen um das 3- bis 10-Fache erhöht und auch bei Diabetes Typ 1 scheint die Apoptose zur Zerstörung der Betazellen zu führen (Mandrup-Poulsen 2001, Mathis et al. 2001, Butler et al. 2003). Daher wurde untersucht, ob TNF- α und IL-1 β nicht nur einen unspezifischen Zelltod, sondern auch eine Apoptose von Betazellen auslösen können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription durch TNF- α und IL-1 β in Betazellen durch die DLK verstärkt wird und zum Teil abhängig von der DLK ist.

Vielversprechend erscheint, dass die Wirkung von TNF- α und IL-1 β nicht nur auf die Funktion, sondern auch auf die Apoptose von Betazellen über die DLK als zentrales Molekül vermittelt werden könnte, daher wurde die Betazellapoptose weiter untersucht.

4.7.1 Effekt von einzeln eingesetztem TNF- α , IL-1 β sowie überexprimierter DLK auf die Betazellapoptose

Die Experimente wurden mittels eines Doppel-Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt, d.h. mit primären Antikörpern, die an die ausgesuchten Strukturen in der Zelle binden konnten und entsprechenden sekundären Antikörpern zur Darstellung über grüne oder

rote Fluoreszenz. Zur Untersuchung der Apoptose wurden Antikörper gegen das große Fragment aktivierter Caspase-3 eingesetzt. Caspase-3 wird bei Aktivierung fragmentiert und bildet in der Endstrecke der Apoptose einen „Punkt ohne Wiederkehr“ (Pop und Salvesen 2009). So konnten die apoptotischen Zellen sicher identifiziert werden. Zusätzlich konnte sowohl die überexprimierte Wildtyp-DLK als auch die inaktive DLK-Mutante durch Antikörper in den Betazellen dargestellt werden. So konnte die Wirkung überexprimierter DLK auf die Apoptose in einzelnen Zellen genau untersucht werden.

Es wurde in pankreatischen Betazellen der Effekt der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β auf das Betazellüberleben untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 β jeweils allein eine signifikante Betazellapoptose auslösen. Behandlung mit TNF- α führt konzentrations- und zeitabhängig zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose auf maximal 10 % (s. Abb. 3.16 A, 3.17 A). Auch Behandlung mit IL-1 β induziert zeit- und konzentrationsabhängig eine signifikante Betazellapoptose von max. 8 % (s. Abb. 3.19 A, 3.20 A).

Jambal et al. zeigten 2003, dass die Behandlung mit einer Zytokinmischung aus TNF- α , IL-1 β und IFN γ eine Apoptose von Betazellen auslösen kann. In den Experimenten dieser Arbeit kann schon die Behandlung der Betazellen mit den einzelnen Zytokinen TNF- α oder IL-1 β eine signifikante Apoptose auslösen. Die Konzentration der eingesetzten Zytokine ist in unseren Experimenten höher als im menschlichen Körper. Im Immunfluoreszenz-Assay induziert Behandlung mit TNF- α ab 10 ng/ml eine signifikante Betazellapoptose, durch Überexpression von DLK schon ab 1 ng/ml. TNF- α kann lokal in einer Konzentration von 5,8 pg/Insel in humanen Langerhans'schen Inseln, und 81 pg/mg in humanem Fettgewebe nachgewiesen werden. Systemisch zirkulierendes TNF- α kann in einer Konzentration von 5,1 pg/ml bei adipösen Patienten und 86 pg/ml in einem adipösen Mausmodell nachgewiesen werden (Hotamisligil et al. 1993, Hotamisligil et al. 1995, Maedler et al. 2002). Eine eingesetzte Konzentration von 1 ng/ml TNF- α bedeutet also das 12-Fache der TNF- α Konzentration im Fettgewebe und das 200-Fache der Konzentration in Langerhans'schen Inseln. Inkubation mit IL-1 β kann in Konzentrationen von 1 ng/ml allein und 0,3 ng/ml bei Überexpression von DLK eine signifikante Betazellapoptose auslösen. In humanen Inseln kann eine IL-1 β Konzentration von 0,2 pg/Insel bei normalen Glukosewerten und 0,6 pg/Insel bei Hyperglykämie gemessen werden (Maedler et al. 2002). Die eingesetzte Konzentration von 0,3 ng/ml IL-1 β beträgt also mindestens das 500-Fache der in vivo nachgewiesenen Konzentration. Auch andere Arbeitsgruppen setzen in vitro vergleichbar höhere Zytokinkonzentrationen, z.B. 10 ng/ml TNF- α bzw. 2 oder 10 ng/ml IL-1 β , ein (Jambal et al. 2003, Abdelli et al. 2007). Die Zytokine TNF- α und IL-1 β könnten daher im menschlichen Körper möglicherweise in anderen Kon-

zentrationen, bzw. nicht allein, sondern synergistisch zusammen wirkend, zu einer Betazellapoptose beitragen. Zusätzlich könnten die Zytokine auch parakrin direkt auf umgebende Zellen wirken, dies könnte möglicherweise die niedrigeren Konzentrationen im menschlichen Körper erklären.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression der MAP3-Kinase DLK auch ohne Zytokin-Behandlung eine signifikante Betazellapoptose ausgelöst wird, während die Überexpression der Kinase-toten Mutante K185A der DLK nicht zu einer signifikant erhöhten Betazellapoptose führt (Plaumann et al. 2008). Die Apoptoseinduktion durch die DLK scheint also abhängig von der enzymatischen Aktivität zu sein. Eine mögliche Erklärung, wie die alleinige Überexpression von DLK ohne weitere Stimulation zur Aktivierung der MAP3K führen könnte, liegt in der Aktivierung durch Autophosphorylierung.

Die Kinase-tote Mutante K185A der DLK kann Dimere bilden, kann aber folgend nicht phosphoryliert werden und ist daher inaktiv (Mata et al. 1996, Nihalani et al. 2000). Die DLK liegt in Ruhe als inaktives Monomer an das Protein JIP (JNK-Interacting-Protein) gebunden vor (Nihalani et al. 2001). Durch Überexpression von DLK könnten in den Betazellen mehr DLK- als JIP-Moleküle vorliegen, so dass ein Teil der überexprimierten DLK ungebunden bleiben und sich über Dimerisierung und Autophosphorylierung selbst aktivieren könnte. Aktive DLK könnte über Aktivierung der MAPK JNK und Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription die oben beschriebene Betazellapoptose vermitteln. Diese Theorie passt zu der Erkenntnis, dass Überexpression von Wildtyp DLK in Fibroblasten-Zelllinien zu Autophosphorylierung und in der Folge zur Aktivierung von JNK führt (Fan et al. 1996, Mata et al. 1996, Nihalani et al. 2000).

4.7.2 Die unterschiedliche Vermittlung der TNF- α - und IL-1 β -induzierten Betazellapoptose in Abhängigkeit von der DLK

Die durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β induzierte Betazellapoptose kann durch die DLK um ein Vielfaches gesteigert werden. Die DLK könnte einen gemeinsamen Signalweg für die durch TNF- α bzw. IL-1 β vermittelten Effekte darstellen. Wie in Abbildung 3.15 gezeigt, kann die TNF- α -induzierte Betazellapoptose durch Überexpression von DLK auf maximal 62 % gesteigert werden. Das entspricht einer 36-Fachen Steigerung der basalen Apoptoserate und einer überadditiven Steigerung um das 8-Fache im Vergleich zur Apoptoseinduktion von TNF- α allein. In Anwesenheit der Kinase-toten Mutante, die auch einen Teil der endogenen DLK durch Bildung von Dimeren inaktivieren könnte, kann durch TNF- α keine signifikante Apoptose ausgelöst werden. Die TNF- α -induzierte Betazellapoptose scheint also zu einem großen Teil über die DLK vermittelt zu

werden und abhängig von der enzymatischen Aktivität der DLK zu sein, denn Überexpression der Kinase-toten Mutante vermindert die TNF- α -induzierte Apoptose signifikant. Die IL-1 β -induzierte Betazellapoptose wird ebenfalls durch Überexpression der DLK überadditiv auf maximal 48 % gesteigert, das 31-Fache der basalen Apoptoserate und die 10-Fache Apoptoserate im Vergleich zum IL-1 β Effekt allein (s. Abb. 3.18). Im Gegensatz zu TNF- α führt Inkubation mit IL-1 β aber auch in Anwesenheit der Kinase-toten DLK-Mutante zu einer signifikanten Apoptose, die dabei niedriger als in Anwesenheit von überexprimierter, enzymatisch aktiver DLK ist. Die IL-1 β -induzierte Betazellapoptose scheint, wie bei TNF- α , über die DLK verstärkt zu werden. Durch IL-1 β kann aber auch bei Überexpression der Kinase-toten DLK-Mutante eine signifikante Apoptose ausgelöst werden. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von IL-1 β nur zum Teil über die DLK und zusätzlich noch über andere Mechanismen vermittelt werden könnte. Dies könnte sowohl die Wirkung von IL-1 β auf die CREB-abhängige Gentranskription als auch auf die Induktion einer Betazellapoptose betreffen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TNF- α und IL-1 β eine Betazellapoptose auslösen, die durch Überexpression von DLK überadditiv gesteigert werden kann. Die DLK könnte über den im Folgenden beschriebenen Signalweg zur Verstärkung der Zytokin-induzierten Apoptose führen. Als MAP3-Kinase aktiviert die DLK über die MAP2-Kinasen MKK4 und MKK7 die MAP-Kinase JNK (Handley et al. 2007). Durch TNF- α und IL-1 β kann JNK ebenfalls aktiviert werden (Abdelli et al. 2007, Hirosumi et al. 2002). Unter basalen Bedingungen ist DLK an das Adapterprotein JIP gebunden. Durch Stimulation von JNK wird JIP phosphoryliert und die DLK wird freigesetzt und aktiviert. Durch aktivierte DLK kann über den MAPK-Signalweg wieder JNK aktiviert werden (Nihalani et al. 2001, 2003). Die gegenseitige Aktivierung der Kinasen DLK und JNK bildet einen sich selbst verstärkenden Regelkreis (Xu et al. 2005). Die in dieser Arbeit gezeigte Verstärkung der TNF- α - und IL-1 β -induzierten Betazellapoptose durch die DLK könnte über diesen Mechanismus vermittelt werden, indem TNF- α und IL-1 β JNK stimulieren, JNK die DLK aktiviert, die wiederum JNK aktiviert.

Über die DLK könnte die in dieser Arbeit gezeigte Zytokin-induzierte Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB auch zur Apoptoseinduktion beitragen. Durch die DLK kann die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription gehemmt werden, vermutlich über Regulierung der CREB-Koaktivatoren CPB und TORC (Oetjen et al. 2006, Phu et al. 2011). Dabei könnte die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription einerseits die Transkription des humanen Insulingens als wichtigste Funktion der Betazellen schädigen (Oetjen et al. 2003b) und andererseits zu einer Betazellapoptose führen. Die Apoptose könnte durch die bei CREB-Hemmung verminderte Genexpression des für das Überleben

von Betazellen wichtigen Insulin Rezeptor Substrats 2 (IRS-2) begünstigt sein (Jhala et al. 2003).

In humanen Langerhans'schen Inseln führen dominant-negative CREB-Mutanten vor allem in den Betazellen zu einer Aktivierung der Caspasen 9 und 3, dem mitochondrialen Weg der Apoptose und verstärken die Zytokin-induzierte Apoptose. Eine vermehrte Aktivierung von CREB schützt dagegen vor einer Zytokin-vermittelten Apoptose (Sarkar et al. 2007). Über die DLK vermittelte CREB-Hemmung könnten TNF- α und IL-1 β also zur Betazell-dysfunktion und Apoptose und damit zum Entstehen von Diabetes Typ 1 und 2 beitragen.

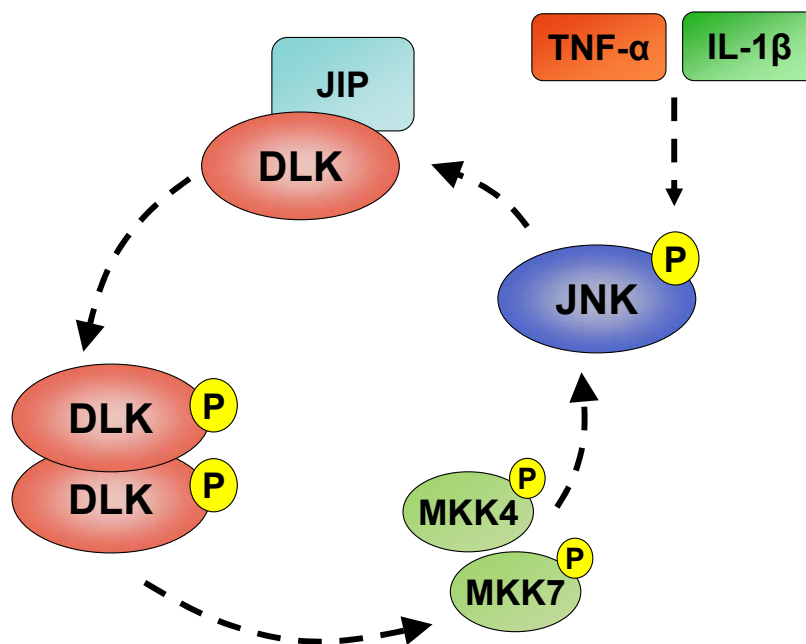


Abb. 4.1: Modell eines sich selbst verstärkenden Regelkreises der Aktivierung von DLK und JNK, ausgelöst durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β (Modifiziert nach Nihalani et al. 2003, Xu et al. 2005.) Durch Stimuli wie die Zytokine TNF- α und IL-1 β kann die MAP-Kinase JNK aktiviert werden. JNK kann das Adapterprotein JIP (JNK-Interacting-Protein) am Thr-103 phosphorylieren. Die Affinität von JIP zur DLK nimmt ab, JIP bindet JNK und die DLK wird freigesetzt. Freie DLK kann homodimerisieren und autophosphorylieren und aktiviert über MKK 4 und 7 wieder JNK. So entsteht eine gegenseitige Verstärkung der JNK- und DLK-Aktivierung.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Diabetes beitragen, könnte möglicherweise in Zukunft helfen, neue Therapieansätze zu entwickeln, die das Entstehen der Krankheit verzögern bzw. eventuell verhindern. Wichtige Mediatoren der Betazellschädigung sind die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , die sowohl bei Typ 1- als auch bei Typ 2-Diabetes vermehrt produziert werden (Maedler et al. 2002, Donath et al. 2003, Mandrup-Poulsen 2003). Die Zytokinwirkung könnte über die MAP3-Kinase DLK und ihre untergeordnete MAPK JNK vermittelt werden (Nihalani et al. 2003). Ein wichtiges Ziel ist die anti-apoptotisch wirkende CREB-abhängige Gentranskription, über die mit der Insulingentranskription eine der Hauptfunktionen der Betazellen reguliert wird (Oetjen et al. 1994, Jhala et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β auf die CRE-/CREB-abhängige Gentranskription und auf die Betazellapoptose sowie die Signalvermittlung über die MAP3K DLK untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch TNF- α und IL-1 β die stimulierte CRE- und CREB-abhängige Gentranskription in Betazellen signifikant gehemmt wird. Außerdem wird durch Überexpression der DLK die TNF- α -vermittelte Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription verstärkt und durch Reduktion endogener DLK die über beide Zytokine, TNF- α und IL-1 β , vermittelte CRE-Hemmung signifikant vermindert. Die Wirkung von TNF- α auf CREB scheint stärker über die DLK vermittelt zu werden als die IL-1 β Wirkung. Über die zum Teil DLK-abhängige Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription könnten die Zytokine eine Funktionsschädigung der Betazellen auslösen, die zur Genese des Diabetes beiträgt.

Weiterhin wird durch TNF- α und IL-1 β eine Betazellapoptose ausgelöst, die durch Überexpression der DLK bei beiden Zytokinen überadditiv gesteigert wird. Die DLK-vermittelte Verstärkung der Zytokinwirkung könnte durch den oben beschriebenen Regelkreis der gegenseitigen Aktivierung von DLK und JNK erklärt werden.

Die TNF- α -induzierte Betazellapoptose scheint zu einem großen Teil DLK-abhängig vermittelt zu werden, da bei Überexpression der katalytisch inaktiven DLK-Mutante durch TNF- α keine signifikante Betazellapoptose ausgelöst wird. Dagegen wird die IL-1 β -induzierte Betazellapoptose zwar über die DLK verstärkt, scheint aber nicht von ihr abhängig zu sein, da durch IL-1 β auch noch bei Überexpression der inaktiven DLK-Mutante eine signifikante Betazellapoptose ausgelöst wird. Dazu passen die Ergebnisse einer weiteren Arbeit aus der Arbeitsgruppe: Es konnte gezeigt werden, dass durch TNF- α die enzymatische Aktivität von DLK und von JNK gesteigert werden konnte. Dagegen konnte durch IL-1 β nur die enzymatische Aktivität von JNK, nicht aber die Aktivität der DLK gesteigert werden (Klimpel 2010). In einer anderen Arbeit aus der Arbeitsgruppe wurde ge-

zeigt, dass für die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von CREB die nukleäre Lokalisation der DLK notwendig ist. Dabei wurde durch beide Zytokine, $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, eine Translokation der DLK in den Nukleus vermittelt (Wallbach 2010). Zusammengefasst könnten diese Ergebnisse für folgendes Modell der Wirkung der Zytokine auf die Betazellen sprechen: Durch $\text{TNF-}\alpha$ könnte die enzymatische Aktivität der DLK direkt erhöht werden. Aktive DLK und $\text{TNF-}\alpha$ könnten die MAPK JNK aktivieren, die wiederum zu einer verstärkten Aktivierung der DLK führen könnte. Nach Translokation in den Zellkern könnte die DLK dann durch Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription eine Betazell dysfunction und Apoptose vermitteln. Dies würde die DLK-Abhängigkeit der Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ auf die CREB-abhängige Gentranskription und die Betazellapoptose erklären.

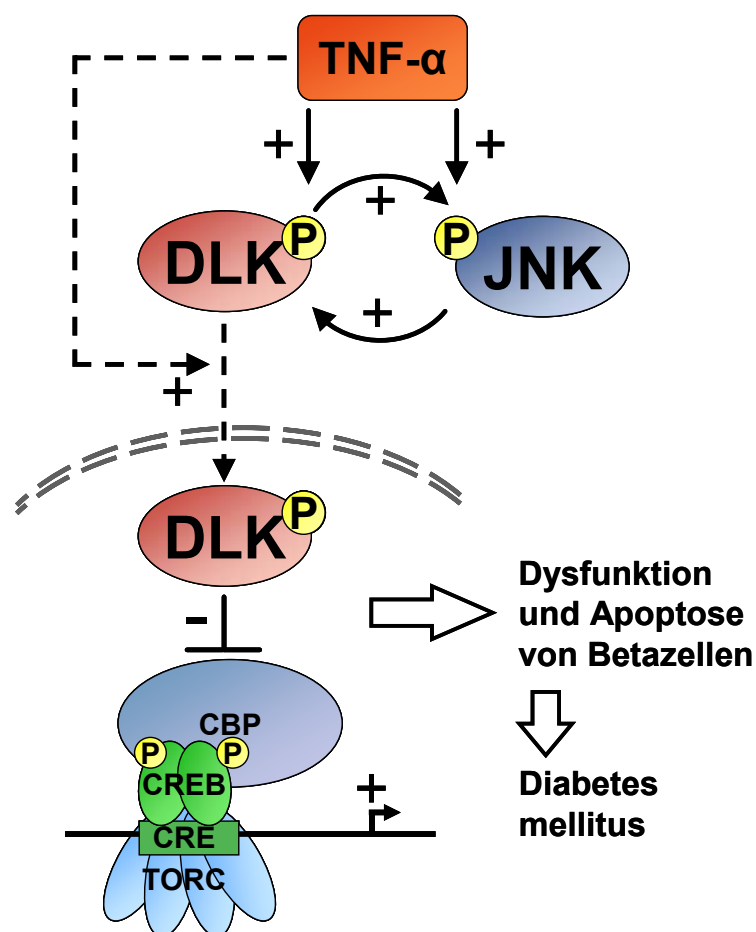


Abb. 4.2: Modellvorschlag, wie $\text{TNF-}\alpha$ über Induktion einer Dysfunktion und Apoptose von Betazellen zur Entstehung von Diabetes mellitus beiträgt (Modifiziert nach Donath et al. 2003, Nihalani et al. 2003, Oetjen et al. 2003b, Størling et al. 2005, Klimpel 2010, Wallbach 2010). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann $\text{TNF-}\alpha$ die CRE-/CREB-abhängige Gentranskription hemmen und eine Apoptose von Betazellen auslösen. Beide Effekte werden durch die DLK verstärkt und scheinen zu einem großen Teil über die DLK vermittelt zu werden. $\text{TNF-}\alpha$ könnte über die Erhöhung der enzymatischen Aktivität von DLK und JNK einen sich gegenseitig verstärkenden Regelkreis der Aktivierung von JNK und DLK anstoßen. Zusätzlich scheint $\text{TNF-}\alpha$ zu einer Translokation der DLK in den Nukleus zu führen. Über nukleäre Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription

könnte die DLK die Funktion der Betazellen verschlechtern, eine Betazellapoptose auslösen und zur Genese von Diabetes beitragen.

Die Wirkung von IL-1 β scheint auf andere Weise vermittelt zu werden. Auch wenn durch IL-1 β die enzymatische Aktivität der DLK nicht direkt erhöhen kann, führt es zu einer Translokation von DLK in den Zellkern. Möglicherweise könnte die DLK erst nukleär aktiviert werden und die transkriptionelle Aktivität von CREB hemmen. Zusätzlich führt IL-1 β direkt zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität von JNK. Einerseits könnte durch aktiviertes JNK möglicherweise ein Teil der DLK indirekt aktiviert werden und über den oben beschriebenen Verstärkungskreis die IL-1 β -induzierte Wirkung verstärken.

Denkbar wäre auch, dass es zu einer Translokation von aktiviertem JNK in den Nukleus mit möglicherweise erst dort stattfindender Aktivierung von DLK kommen könnte (Liu et al. 2006).

Ob nicht nur über die DLK, sondern auch über JNK direkt die CREB-abhängige Gentranskription beeinflusst werden könnte, ist bisher unklar. Es könnte sinnvoll sein, dies in weiteren Experimenten zu untersuchen, da es einige Hinweise für die Beteiligung von JNK an einer Apoptoseinduktion und Vermittlung einer Zytokinwirkung gibt. JNK kann in Neuronen eine Apoptose auslösen, da Aktivierung von JNK zu erhöhten Leveln des Transkriptionsfaktors c-Jun führt. Dagegen schützen dominant-negative Formen von c-Jun vor einer Apoptose der Neuronen. Zusätzlich scheint aktiviertes JNK über die Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von Caspasen in Neuronen zu einer Apoptose zu führen (Xu et al. 2001). Behandlung mit IL-1 β und IFN- γ führt in Betazellen zu einer Aktivierung von JNK und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun (Gurzov et al. 2009). Über JNK kann IL-1 β eine Apoptose in pankreatischen Inseln von Ratten induzieren (Abdelli et al. 2007). Hemmung von JNK konnte dagegen in einer Betazelllinie vor einer IL-1 β -induzierten Apoptose schützen (Ammendrup et al. 2000).

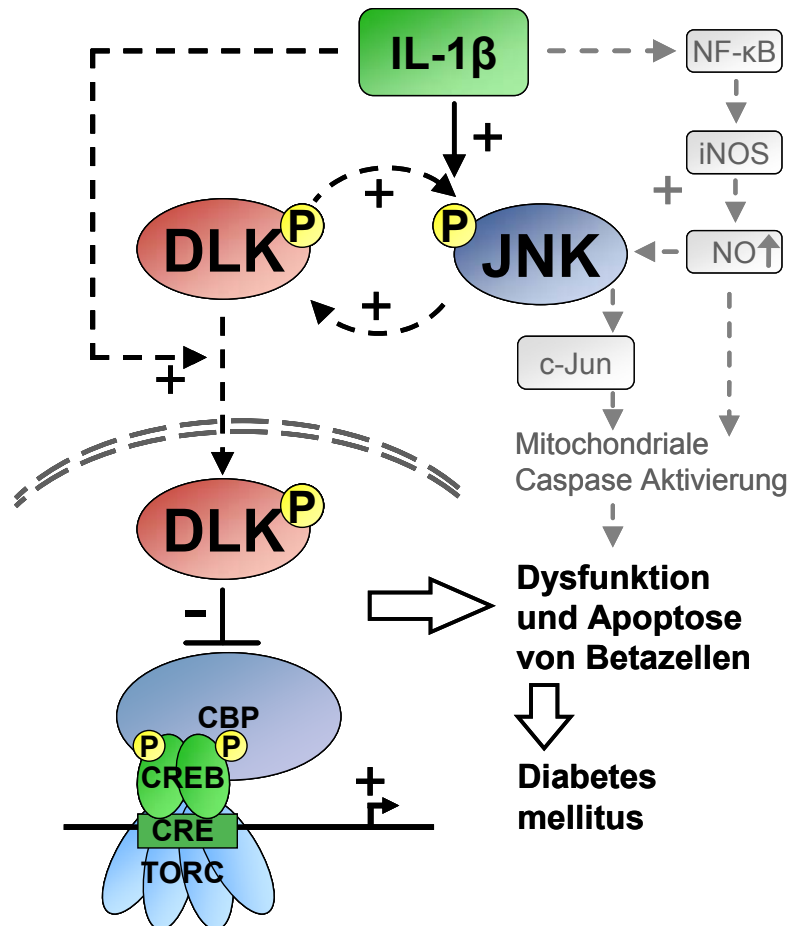


Abb. 4.3: Modellvorschlag, wie IL-1 β über Induktion einer Dysfunktion und Apoptose von Betazellen zur Entstehung von Diabetes mellitus beiträgt (Modifiziert nach Donath et al. 2003, Nihalani et al. 2003, Oetjen et al. 2003b, Størling et al. 2005, Ortis et al. 2006, 2010, Klimpel 2010, Wallbach 2010). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann IL-1 β die CRE-/CREB-abhängige Gentranskription hemmen und eine Apoptose von Betazellen auslösen. Beide Effekte werden durch die DLK verstärkt, können durch IL-1 β aber zum Teil unabhängig von der DLK vermittelt werden. IL-1 β scheint zu einer Translokation der DLK in den Zellkern zu führen und könnte die enzymatische Aktivität von JNK, aber nicht der DLK erhöhen. Möglicherweise könnte über Aktivierung von JNK indirekt DLK zum Teil aktiviert werden und eine Verstärkung der IL-1 β Wirkung vermitteln. Mittels Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription könnte die DLK die Funktion der Betazellen verschlechtern, eine Betazellapoptose auslösen und zur Genese von Diabetes beitragen. In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass der betazellschädliche Effekt von IL-1 β zum Teil DLK-unabhängig ist. IL-1 β könnte über Aktivierung von NF- κ B und Produktion von NO ebenfalls zur Betazellapoptose beitragen und mittels NO die JNK-Aktivierung verstärken. JNK könnte über Regulation des Transkriptionsfaktors c-Jun zusätzlich eine mitochondriale Caspase-Aktivierung vermitteln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Induktion einer Betazellapoptose durch IL-1 β zum Teil unabhängig von der DLK vermittelt werden könnte. Ein möglicher Mechanismus ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nukleärer Faktor Kappa B) und darüber die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Sowohl NF- κ B als auch NO können zu einer Zytokin-induzierten Apoptose beitragen (Størling et al. 2005, Ortis et al. 2006). Durch beide Zytokine, TNF- α und IL-1 β , kann über Degradation des hemmenden

Proteins I κ B NF- κ B freigesetzt und aktiviert werden. Dabei ist die Aktivierung von NF- κ B durch IL-1 β früher und stärker ausgeprägt als bei TNF- α (Ortis et al. 2010). Über NF- κ B wird die Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) in Betazellen reguliert (Cnop et al. 2005). TNF- α und IL-1 β führen über vermehrte Expression von iNOS zu einer verstärkten Produktion von NO in Betazellen (Cetkovic-Cvrlje und Eizirik 1994, Ortis et al. 2006). NO ist für die Betazellfunktion wichtig. IL-1 β und TNF- α regulieren unterschiedliche proinflammatorische Gene in Betazellen und fast 50 % der durch Zytokine modulierten Gene sind NO-abhängig (Ortis et al. 2010). Wie bei NF- κ B kann IL-1 β auch die NO-Produktion stärker aktivieren als TNF- α und eine Betazellapoptose über den mitochondrialen Signalweg auslösen (Holohan et al. 2008). Zudem kann IL-1 β über Aktivierung von NO zusätzlich zu einer JNK-Aktivierung beitragen. Hemmung von NO reicht aber nicht aus, um eine Zytokin-induzierte Apoptose humaner Inseln zu verhindern (Størling et al. 2005). Die Produktion von NO könnte also zur Verschlechterung von Betazellfunktion- und Überleben durch die Zytokine beitragen, könnte aber eventuell nicht allein ausreichen, um eine Apoptose zu vermitteln.

Zusammenfassend könnte die TNF- α -induzierte Betazell dysfunction und Apoptose vor allem über die DLK und die von ihr regulierte CREB-Hemmung vermittelt werden, dabei könnten JNK und DLK sich gegenseitig verstärken.

Die IL-1 β -induzierte Betazellschädigung könnte über Aktivierung von JNK und eher indirekte DLK-Aktivierung vermittelt werden. Zusätzlich könnte IL-1 β über Aktivierung von NF- κ B und iNOS Expression zu einer erhöhten NO-Produktion führen, über NO die Aktivierung von JNK verstärken und so zusätzlich zum DLK-vermittelten Signalweg zu einer Betazellapoptose beitragen (Størling et al. 2005). Die Zytokin-induzierte Dysfunction und Apoptose von Betazellen könnten zum Entstehen von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 beitragen.

Um den Beitrag der proinflammatorischen Zytokine zur prädiabetischen Stoffwechsellage und dem Entstehen von Diabetes mellitus noch besser zu verstehen, könnte es in Zukunft sinnvoll sein, die Wirkung von TNF- α und IL-1 β im Zellverbund humaner Langerhans'scher Inseln zu untersuchen. Eine Untersuchung der Interaktion der übrigen endokrinen Zellen in den Langerhans'schen Inseln könnte helfen, die Wirkung der Zytokine noch genauer zu verstehen. Vorstellbar wäre, dass über parakrine Interaktion die Zytokine schon in geringerer, physiologisch nachweisbarer Konzentration oder synergistisch zusammenwirkend die Betazellen schädigen könnten (Maedler et al. 2002).

Neue Ansätze zur Therapie des Diabetes haben einzelne Moleküle der molekularen Signalkaskaden zum Ziel. Etanercept ist ein Fusionsprotein aus dem löslichen TNF-Rezeptor und dem Fc-Fragment von IgG1, das die TNF- α -Bindung an den Rezeptor blockiert und in der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird (Bernstein et al. 2006). Einige

Studien berichten, dass Behandlung von Patienten mit dem metabolischen Syndrom oder Typ 2-Diabetes mit Etanercept nicht zu einer verbesserten Insulinsensitivität führt (Paquot et al. 2000, Dominguez et al. 2005, Bernstein et al. 2006). Eine länger andauernde Gabe von Etanercept über 6 Monate verbessert bei adipösen Patienten, die die Kriterien des metabolischen Syndroms erfüllen, die Nüchtern glukosewerte (Stanley et al. 2011). Die Gabe eines TNF- α -Antikörpers scheint bei Typ 2-Diabetes-Patienten keinen Effekt auf die Insulinsensitivität zu haben (Ofei et al. 1996). Da die TNF- α -Expression im Fettgewebe begründet ist, könnten möglicherweise vor allem deutlich adipöse Patienten von einer die TNF- α -Signalwege-hemmenden Therapie profitieren.

Behandlung von Typ 2-Diabetes-Patienten mit dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten Anakinra reduziert die HbA1c-Level und verbessert die sekretorische Funktion der Betazellen (Larsen et al. 2007, Larsen et al. 2009). IL-Rezeptor-Antagonisten haben aber eine kurze Halbwertszeit, müssen täglich subcutan injiziert werden und führen zu Nebenwirkungen an der Einstichstelle. Deshalb könnte Gevokizumab, ein Antikörper gegen IL-1 β , der ein Mal pro Monat gegeben wird, besser geeignet sein. Bei Typ 2-Diabetes-Patienten konnte dieser IL-1 β -Antikörper ebenfalls die HbA1c-Level verringern und die C-Peptid-Freisetzung als Marker für die Sekretion der Betazellen erhöhen (Cavelti-Weder et al. 2012). Inhibitoren von IL-1 β könnten also vielversprechend in der Diabetestherapie sein.

Weitere mögliche neue therapeutische Ziele könnten die Signalwege über NF- κ B oder MAP-Kinasen umfassen (O'Neill 2006). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die MAP3-Kinase DLK eine zentrale Rolle in der TNF- α - und IL-1 β -vermittelten Betazellschädigung einnimmt, die zur Entstehung von Diabetes beiträgt. Daher könnte es sinnvoll sein, die Wirkung der DLK weiter zu untersuchen. In einer ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Arbeit konnte bestätigt werden, dass die DLK nach Stimulation mit den Zytokinen TNF- α und IL-1 β verstärkt im Kern lokalisiert ist. Es konnte eine Kernerkennungssequenz identifiziert werden, nach deren Mutation es zu einer geringeren Translokation der DLK in den Zellkern und einer geringeren Hemmung der CRE-/CREB-abhängigen Gentranskription kam. Hemmung der Wirkung der DLK im Zellkern durch Interferenz mit der Kernerkennungssequenz könnte ein möglicher therapeutischer Ansatz sein (Wallbach 2010).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz könnte in Zukunft die Hemmung der Proteinkinasen, z.B. durch Moleküle, die kompetitiv zu ATP an die Kinasen binden, sein. Solche Hemmstoffe könnten allerdings ein Organsystem positiv und gleichzeitig ein anderes negativ beeinflussen. Die in Betazellen schädigende Signale vermittelnde DLK ist bei der Gehirnentwicklung von Mäusen für die neuronale Migration und das Axonwachstum essenziell (Hirai et al. 2006). Die Hemmung von vorgeschalteten MAP3-Kinasen durch einen Proteinkinase-Inhibitor könnte spezifischer sein als die Hemmung der in vielen Geweben

exprimierten MAP-Kinase JNK (Force et al. 2004). Ein möglicher Inhibitor der DLK müsste also möglichst gewebespezifisch wirken.

Der Proteinkinase-Inhibitor Tozasertib ist eine niedermolekulare Verbindung (small molecule, entsprechend: „kleines Molekül“). Er wurde ursprünglich als Inhibitor einer Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen, genannt Aurora-Kinasen, für die Behandlung von onkologischen Erkrankungen entwickelt, kann aber auch die DLK inhibitorisch binden. In Mäusen trägt die Signalvermittlung über die DLK maßgeblich zum Zelltod retinaler Ganglionzellen bei, der Einsatz von Tozasertib konnte vor einem Zelltod schützen und könnte so zur Therapie des Glaukoms beitragen. Die Wirkung von Tozasertib scheint über Hemmung der DLK vermittelt zu werden und DLK-abhängig zu sein (Welsbie et al. 2013). Möglicherweise könnte ein DLK-Inhibitor wie Tozasertib auch in der Therapie des Diabetes eingesetzt werden, dazu könnten weitere Experimente, z.B. zur Gewebespezifität und möglichen Wirkung in Betazellen bzw. Langerhans'schen Inseln, sinnvoll sein.

Zusammenfassend kann diese Arbeit auf experimenteller Ebene zum genaueren Verständnis eines Teils der die Betazellen schädigenden Mechanismen in der Entstehung von Diabetes mellitus beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dysfunktion und Apoptose von Betazellen, die durch $\text{TNF-}\alpha$ induziert ist, zu einem großen Teil und die durch $\text{IL-1}\beta$ induzierte Wirkung zu einem geringeren Teil über die DLK vermittelt wird. Daher könnte die Hemmung der DLK einen zukünftigen Ansatz in der Therapie des Diabetes mellitus darstellen.

5. Zusammenfassung

Im Jahr 2008 gab es weltweit 347 Millionen Diabetiker bei weiter zunehmender Inzidenz. Die beiden größten Unterformen sind mit 90 % Typ 2- und 10 % Typ 1-Diabetes (Danaei et al. 2011). Beiden Diabetesformen sind eine Dysfunktion und ein Zelltod der Betazellen durch Apoptose gemeinsam, die Betazellschädigung wird dabei über ähnliche Signaltransduktionewege vermittelt. Ein wichtiger Gegenspieler der Betazellapoptose ist der Transkriptionsfaktor CREB, der an der Regulation der Insulingentranskription beteiligt und wichtig für das Betazellüberleben ist (Oetjen et al. 1994, Jhala et al. 2003). Durch die MAP3-Kinase DLK kann die transkriptionelle Aktivität von CREB in Betazellen gehemmt werden (Oetjen et al. 2006). Als übergeordnete MAP3K kann DLK die Apoptose-regulierende MAP-Kinase JNK aktivieren und von ihr wieder aktiviert werden (Handley et al. 2007). Die bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 vermehrt produzierten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β können ebenfalls JNK aktivieren (Mandrup-Poulsen 2003). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die CREB-abhängige Gentranskription im Luciferase-Reporter-Assay und auf das Absterben und die Apoptose von Betazellen im MTT-Test und Immunfluoreszenz-Assay in der Betazelllinie HIT-T15 untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zytokinwirkung DLK-abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 β die stimulierte CRE-/CREB-abhängige Gentranskription hemmen, Überexpression von DLK verstärkt diese Wirkung, bei TNF- α mehr als bei IL-1 β . Verminderung der endogenen DLK durch siRNA reduziert die TNF- α - und IL-1 β -induzierte CREB-Hemmung. Beide Zytokine konnten eine Betazellapoptose auslösen, die ebenfalls durch die DLK verstärkt wird. Bei Überexpression einer Kinasetoten DLK-Mutante konnte durch TNF- α keine Apoptose induziert werden, aber durch IL-1 β , dies spricht dafür, dass die Wirkung von TNF- α zu einem größeren Teil abhängig von der DLK ist als die Wirkung von IL-1 β , die zum Teil DLK-unabhängig vermittelt wird. Zusammengefasst könnte TNF- α über Aktivierung von DLK und JNK und anschließend gegenseitiger Signalamplifikation beider Kinasen zu einer DLK-vermittelten Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription führen, eine Betazell dysfunktion und Apoptose vermitteln und zur Entstehung von Diabetes beitragen. Dagegen könnte IL-1 β über Aktivierung von JNK indirekt die DLK aktivieren und zu einer CREB-Hemmung führen. Die DLK scheint eine zentrale Rolle in der Zytokin-induzierten Betazellschädigung einzunehmen. Eine gewebespezifische Hemmung der DLK, wie z.B. über den Proteinkinaseinhibitor Tozasertib im Glaukommodell gezeigt (Welsbie et al. 2013), könnte daher auch einen neuen Ansatz in der Therapie des Diabetes mellitus darstellen.

6. Anhang

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt als Artikel einer Fachzeitschrift bzw. im Rahmen von Posterpräsentationen und gedruckten Abstracts auf folgenden Kongressen veröffentlicht:

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

51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie gemeinsam mit der 12. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel, Salzburg 07.-10.03.2007: Increase of Interleukin-1 β -induced beta-cell apoptosis by the dual-leucine-zipper-bearing kinase. Svenja Borchers, Roland Blume, Willhart Knepel, Elke Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

German Institute of Human Nutrition (DIfE) Symposium, Potsdam-Rehbrücke 14.02.-15.02.2008: The activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase DLK contributes to the damaging effects of TNF- α on pancreatic islet beta-cells. Svenja Borchers, Catarina Klimpel, Roland Blume, Elke Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG), München 30.04.-03.05.2008: Die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase trägt zu dem TNF- α -induzierten Verlust der Beta-Zellmasse und -funktion bei. Svenja Borchers, Catarina Klimpel, Roland Blume, Elke Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz 10.03.-12.03.2009: Induction of beta-cell apoptosis by the proinflammatory cytokine IL-1 β not involving the apoptosis-inducing dual leucine zipper bearing kinase DLK. Catarina Klimpel, Svenja Borchers, Elke Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

7. Literaturverzeichnis

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

American Diabetes Association (2008): Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care* 31, 596-615

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

Ashcroft SJ, Hammonds P, Harrison DE (1986): Insulin secretory responses of a clonal cell line of simian virus 40-transformed B cells. *Diabetologia* 29, 727-733

Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001): Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229

Bernstein LE, Berry J, Kim S, Canavan B, Grinspoon SK (2006): Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch Intern Med* 166, 902-908

Berridge MV, Tan AS (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482

Birge RB, Ucker DS (2008): Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ* 15, 1096-1102

Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H (1976): Biological effects of cyclosporinA: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-475

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

Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, Solinger AM, Mandrup-Poulsen T, Dinarello CA, Donath MY (2012): Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35, 1654-1662

Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL (1994): TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6, 399-406

Chadban S (2008): New-onset diabetes after transplantation - should it be a factor in choosing an immunosuppressant regimen for kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 23, 1816-1818

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805

Chen HQ, Veluthakal R, Palanivel R, Kowluru A (2004): GTP-binding protein-independent potentiation by mastoparan of IL-1 β -induced nitric oxide release from insulin-secreting HIT-T15 cells. *Apoptosis* 9, 145-148

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

Cook DL, Satin LS, Hopkins WF (1991): Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci* 14, 411-414

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

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M (2011): National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31-40

Delaney CA, Green MHL, Lowe JE, Green IC (1993): Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 β in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. *FEBS Lett* 333, 291-295

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

Dinarello CA (2010): IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 40, 595-606

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

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

Eggers A, Siemann G, Blume R, Knepel W (1998): Gene-specific transcriptional activity of the insulin cAMP-responsive element is conferred by NF-Y in combination with cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem* 273, 18499-18508

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50

Fan G, Merritt SE, Kortjenann M, Shaw PE, Holzman LB (1996): Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46^{SAPK} and p38^{mapk} but Not ERK2. *J Biol Chem* 271, 24788-24793

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Diver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811

Force T, Kuida K, Namchuk M, Parang K, Kyriakis JM (2004): Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. *Circulation* 109, 1196-1205

Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA, Gosset G, Li M, Cardozo AK, Eizirik DL (2009): Signaling by IL-1 β + IFN- γ and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Differ* 16, 1539-1550

Handley ME, Rasaiyaah J, Chain BM, Katz DR (2007): Mixed lineage kinases (MLKs): a role in dendritic cells, inflammation and immunity? *Int J Exp Pathol* 88, 111-126

Helmchen U, Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W (1984): Morphological and functional changes of pancreatic B cells in cyclosporin A-treated rats. *Diabetologia* 27, 416-418

Herold G und Mitarbeiter (2009): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Auflage 2009. Gerd Herold Verlag, Köln 2009

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

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

Holohan C, Szegezdi E, Ritter T, O'Brian T, Samali A (2008): Cytokine-induced beta-cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL. *J Cell Mod Med* 12, 591-606

Holz GG, Habener JF (1992): Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic β -cells and the glucose competence concept. *Trends Biochem Sci* 17, 388-393

Holzman LB, Merritt SE, Fan G (1994): Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 269, 30808-30817

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

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelmann BM (1995): Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415

Hui H, Dotta F, Di Mario U, Perfetti R (2004): Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* 200, 177-200

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

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

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

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

Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, 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

Keahey HH, Rajan AS, Boyd AE 3rd, Kunze DL (1989): Characterization of voltage-dependent Ca^{2+} channels in β -Cell line. *Diabetes* 38, 188-193

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257

Klimpel C: Wirkung der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die Aktivität und die Proteinmenge der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase in einer Betazelllinie. *Med. Diss. Göttingen* 2010

Kolb H, Mandrup-Poulsen T (2010): The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 53, 10-20

Krammer PH (2000): Apoptose. *Dtsch Arztlbl* 97, 1752-1759

Krauthaim A, Brechlin P, Becker K, Winkler M, Steinfeldt HJ (2000): Hamster pancreatic beta cell lines with altered sensitivity towards apoptotic signalling by phosphatase inhibitors. *Br J Pharmacol* 129, 687-694

Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehres JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007): Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517-26

Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehses JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T (2009): Sustained effects of interleukin-1-receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 1663-1668

Leung IW, Lassam N (1998): Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J Biol Chem* 273, 32408-32415

Liu XM, Pei DS, Guan QH, Sun YF, Wang XT, Zhang QX, Zhang GY (2006): Neuroprotection of Tat-GluR6-9c against neuronal death induced by kainate in rat hippocampus via nuclear and non-nuclear pathways. *J Biol Chem* 281, 17432-17445

Maedler K, Donath MY (2004): Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res.* 62, 67-73

Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY (2002): Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110, 851-860

Mandrup-Poulsen T (2001): β -Cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* 50, 58-63

Mandrup-Poulsen T (2003): Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 66, 1433-1440

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

Mathis D, Vence L, Benoist C (2001): Beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792-798

Matsuda S, Koyasu S (2000): Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119-125

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

Merritt SE, Mata M, Nihalani D, Zhu C, Hu X, Holzman LB (1999): The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *J Biol Chem* 274, 10195-10202

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS (2003): Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 289, 76-79

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63

Nihalani D, Merritt S, Holzman LB (2000): Identification of structural and functional domains in mixed lineage kinase dual leucine zipper-bearing kinase required for complex formation and stress-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 275, 7273-7279

Nihalani D, Meyer D, Pajni S, Holzman LB (2001): Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. *The EMBO Journal* 20, 3447-3458

Nihalani D, Wong HN, 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

O'Neill LAJ (2006): Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 5, 549-563

Oetjen E, Diedrich T, Eggers A, Eckert B, Knepel W (1994): Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem* 269, 27036-27044

Oetjen E, Baun, D, Beimesche S, Krause D, Cierny I, Blume R, Dickel C, Wehner S, Knepel W (2003a): Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporine A and tacrolimus in primary, mature islet of transgenic mice. *Mol Pharmacol* 63, 1289-1295

Oetjen E, Grapentin D, Blume R, Seeger M, Krause D, Eggers A, Knepel W (2003b): Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367, 227-236

Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P, Knepel W (2005): The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *Br J Pharmacol* 144, 982-993

Oetjen E, Lechleiter A, Blume R, Nihalani D, Holzman L, Knepel W (2006): Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. *Diabetologia* 49, 332-342

Oetjen E, Blume R, Cierny I, Schlag C, Kutschenko A, Krätzner R, Stein R, Knepel W (2007): Inhibition of MafA transcriptional activity and human insulin gene transcription by interleukin-1 β and mitogen-activated protein kinase kinase kinase in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia* 50, 1678-1687

Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R (1996): Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881-5

Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Størling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL (2006): Cytokine-Induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor- κ B activation. *Mol Endocrinol* 20, 1867-1879

Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrière L, Moore F, Cunha DA, Colli ML, Thykjaer T, Thorsen K, Ørntoft TF, Eizirik DL (2010): Cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary β -cells. *Diabetes* 59, 358-374

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G (2010): Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J Intern Med* 267, 44-53

Paquot N, Castillo MJ, Lefèbvre PJ, Scheen AJ (2000): No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 1316-1319

Penfornis A, Kury-Paulin S (2006): Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab* 32, 539-546

Phu DT, Wallbach M, Depatie C, Fu A, Screatton RA, Oetjen E (2011): Regulation of the CREB coactivator TORC by the dual leucine zipper kinase at different levels. *Cell Signal* 23, 344-353

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

Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, Krogh-Madsen R, Erikstrup C, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Pedersen BK (2007): Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 2562-2571

Pop C, Salvesen GS (2009): Human Caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284, 21777-21781

Rathmann W, Scheidt-Nave C, Roden M, Herder C (2013): Typ-2-Diabetes: Prävalenz und Relevanz angeborener und erworbener Faktoren für die Prädiktion. *Dtsch Arztebl* 110, 331-337

Reid BG, Flynn GC (1997): Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36, 6786-6791

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

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

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

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1999): Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107, 489-506

Saltiel AR, Kahn CR (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806

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

Santerre RF, Cook RA, Crisel RMD, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP (1981): Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. Proc Natl Acad Sci USA 78, 4339-4343

Sarkar SA, Gunter J, Bouchard R, Reusch JEB, Wisemann A, Gill RG, Hutton JC, Pugazhenti S (2007): Dominant negative mutant forms of the cAMP response element binding protein induce apoptosis and decrease the anti-apoptotic action of growth factors in human islets. Diabetologia 50, 1649-1659

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 17, 1675-1687

Schreiber SL, Crabtree GR (1992): The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol Today 13, 136-142

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

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

Schwanger M, Blume R, Oetjen E, Knepel W (1993c): The immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 inhibit calcineurin phosphatase activity and gene transcription mediated through the cAMP-responsive element in a nonimmune cell line. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 348, 541-545

Schwanger M, Blume R, Krüger M, Lux G, Oetjen E, Knepel W (1995a): Involvement of the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin in gene transcription that is stimulated by cAMP through cAMP response elements. J Biol Chem 270, 8860-8866

Schwanger M, Schöfl C, Blume R, Rössig L, Knepel W (1995b): Inhibition by antidepressant drugs of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-directed gene transcription. Mol Pharmacology 47, 1112-1118

Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981): Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 3363-3367

Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS, Grinspoon SK (2011): TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 146-150

Statistisches Bundesamt (Zweigstelle Bonn), Robert-Koch-Institut, www.gbe-bund.de (2008): Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die häufigsten Todesursachen, Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10.

Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinass GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T (2005): Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia* 48, 2039-2050

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005): Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333-1346

Thomas TP, Pek SB (1992): Diacylglycerol Inhibits potassium-induced calcium influx and insulin release by a protein kinase-C-independent mechanism in HIT T-15 islet cells. *Endocrinology* 131, 1985-1992

Tsiotra PC, Tsigos C, Raptis SA (2001): TNF α and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 1018-1026

Tuschl T, Borkhardt A (2002): Small Interfering RNAs: A revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2, 158-167

U.S.Multicenter FK506 Liver Study Group (1994): A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 331, 1110-1115

Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, Uchida K, Pescovitz MD, Marchetti P, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Chadban S, El-Shahawy M, Budde K, Goto N (2007): Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant* 7, 1506-1514

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65

Wallbach M: Identifikation einer funktionellen Kernerkennungssequenz in der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase. Med. Diss. Göttingen 2010

Walton KM, Rehfuß RP, Chrivia JC, Lochner JE, Goodman RH (1992): A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol* 6, 647-655

Welsbie DS, Yang Z, Ge Y, Mitchell KL, Zhou X, Martin SE, Berlinicke CA, Hackler Jr. L, Fuller J, Fu J, Cao LH, Han B, Auld D, Xue T, Hirai SI, Germanin L, Simard-Bisson C, Blouin R, Nguyen JV, Davis CHO, Enke RA, Boye SL, Merbs SL, Marsh-Armstrong N, Hauswirth WW, DiAntonio A, Nickells RW, Inglese J, Hanes J, Yau KW, Quigley HA, Zack DJ (2013): Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 4045-4050

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004): Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053

World Health Organization, www.who.int (2009): Fact Sheet N° 312 Diabetes

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

Xu Z, Kukekov NV, Greene LA (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, 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

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Elke Oetjen für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas. Besonders hervorheben möchte die hervorragende Betreuung und Motivation durch sie über die gesamte Zeit, ihre wertvollen Anregungen und die inspirierenden Diskussionen mit ihr sowohl über die praktischen als auch die theoretischen Aspekte der vorliegenden Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei ihr für die geduldige Durchsicht und Beratung bei der Verfassung der Arbeit sowie bei der Ausarbeitung von Postern und Präsentationen bedanken.

Ich danke allen Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Elke Oetjen sowie der gesamten Abteilung Pharmakologie für anregende und hilfreiche Gespräche in einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Herrn MTA R. Blume, der mich in der Arbeit mit Zellkulturen und vielen weiteren praktischen Themen unterstützt hat und Frau Dr. med. Silke Plaumann für die vor allem zu Beginn der Arbeit hilfreichen Anregungen. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. med. Catarina Klimpel und Frau Dr. rer. nat. Annette Heinrich für die offenen und anregenden Diskussionen bedanken.

Ein großer Dank gilt weiterhin meinen ärztlichen Kollegen und allen Mitarbeitern der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin im Reinhard-Nieter-Krankenhaus Wilhelmshaven, vor allem meinem Chefarzt Herrn Dr. med. Liebner für motivierende und anregende Gespräche zum Thema Diabetes.

