

Aus der Abteilung 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 Aktivität und die Proteinmenge 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
Catarina Klimpel
aus Rostock

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

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

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 30. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	<i>IX</i>
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus	1
1.1.2 Physiologie der Glukosehomöostase.....	2
1.1.3 Pathogenese des Diabetes mellitus – Reduktion der Betazellmasse als zentraler Mechanismus in Typ 1 und Typ 2.....	3
1.2 Die Zytokine TNFα und IL-1β und ihre Signalwege	5
1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	8
1.3.1 Allgemeine Prinzipien der Signaltransduktion über MAPK.....	8
1.3.2 Gerüstproteine in der Signalkaskade	10
1.4 Die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase	11
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien und Reagenzien	16
2.2 Enzyme	18
2.3 Medienbestandteile und Seren	18
2.4 Antibiotika	18
2.5 Antikörper	19
2.6 Standardgrößenmarker für Gele	20
2.7 Expressionsvektoren (Plasmid-DNA)	20
2.8 Small interfering RNA (siRNA)	21
2.9 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	21
2.10 Verbrauchsmaterialien	21

2.11	Geräte und Zubehör	22
2.12	Sterilisationsverfahren	24
2.13	Klonierung und Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.13.1	Bakterienstämme	24
2.13.2	Transformation kompetenter E. coli.....	25
2.13.3	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	25
2.13.4	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	28
2.13.5	Restriktionsverdau.....	28
2.13.6	Horizontale Agarosegelelektrophorese	29
2.14	Transiente Transfektion	30
2.14.1	Transfektion von siRNA	30
2.14.2	Transfektion von Plasmid-DNA nach der METAFECTENE™-Methode.....	31
2.15	Standardtechniken für das Arbeiten mit Zellkulturen	32
2.15.1	Zelllinie HIT-T15	32
2.15.2	Medien und Puffer.....	32
2.15.3	Standardbedingungen der Zellkultivierung.....	32
2.15.4	Splitten der HIT-T15-Zellen (Zellpassagierung)	33
2.15.5	Mediumwechsel	34
2.15.6	Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für die Versuchsreihen.....	34
2.15.7	Behandlung der Zellen mit Reagenzien	35
2.16	Methoden zur Proteincharakterisierung	38
2.16.1	Zellyse und Herstellung von Zellextrakten	38
2.16.2	Photometrische Proteinbestimmung.....	39
2.16.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	40
2.16.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.16.3.2	Blotten nach der Semi-Dry-Blot-Methode.....	41
2.16.3.3	Antigen-Antikörper-Reaktion und Entwicklung von ECL-Filmen.....	42
2.16.4	Immunpräzipitation	43
2.16.4.1	Immunpräzipitation mit dem DLK-Antikörper von Holzman et al. (1994).	44
2.16.4.2	Immunpräzipitation mit dem DLK-Antikörper von Hirai et al. (2006)	44
2.17	In-vitro-Kinase-Assay	45
2.17.1	Standardtechniken für das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen.....	45

2.17.2	In-vitro-Kinase-Assay	46
2.18	Auswertung und Statistik	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNFα auf die DLK.....	48
3.1.1	Die Wirkung von TNF α auf die enzymatische Aktivität der DLK in einer pankreatischen Betazelllinie.....	48
3.1.1.1	Effizienz der Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen den C- Terminus der DLK	48
3.1.1.2	Kinase-Assay mit immunpräzipitierter DLK	49
3.1.2	Phosphorylierung der der DLK untergeordneten Kinase JNK in Abhängigkeit von der DLK.....	52
3.1.2.1	Ermittlung der Halbwertszeit der DLK	52
3.1.2.2	JNK-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der DLK.....	53
3.1.3	Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125 auf die TNF α -induzierte Steigerung der Kinase-Aktivität der DLK	56
3.1.3.1	Effizienz der Immunpräzipitation mit dem m5F4-DLK-Antikörper	57
3.1.3.2	Kinase-Assay mit immunpräzipitierter DLK	57
3.1.4	TNF α -induzierte Apoptose in Abhängigkeit von der DLK.....	60
3.2	Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1β auf die DLK	63
3.2.1	Die Wirkung von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität der DLK in einer pankreatischen Betazelllinie.....	63
3.2.2	Phosphorylierung der der DLK untergeordneten Kinase JNK.....	66
3.3	Auswirkung der Zytokine TNFα und IL-1β auf die Proteinmenge der DLK in den HIT-T15-Zellen	68
3.3.1	Quantifizierung der Zytokin-induzierten Reduktion der DLK	68
3.3.2	Zytokin-induzierte Reduktion der DLK bei Inhibition des Proteasoms	70
3.3.3	Zytokin-induzierte Reduktion der DLK bei Inhibition der Proteinsynthese.....	72
3.3.4	Zytokin-induzierte Degradation der DLK bei Kinase-toten Mutanten	75
4	Diskussion.....	78
4.1	HIT-T15-Zellen als geeignetes Modell für die Untersuchung der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2	78

4.2	Wirkung des proinflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ auf die DLK und die ihr untergeordnete MAPK JNK	80
4.3	Wirkung des proinflammatorischen Zytokins $IL-1\beta$ auf die DLK und die ihr untergeordnete MAPK JNK	86
4.4	Bedeutung der Auswirkung der Zytokine $TNF\alpha$ und $IL-1\beta$ auf die DLK und den MAPK-Signalweg für die Pathogenese des Diabetes mellitus im Vergleich	89
4.5	Schlussfolgerung.....	94
5	Zusammenfassung.....	96
6	Anhang.....	97
7	Literaturverzeichnis.....	98

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Activator-Protein-1-Transkriptions-Faktor-Komplex
AS	Aminosäure
ASK	Apoptosis signal-regulating kinase
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-xL	B-cell-lymphoma-extra large
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
CBP	CREB-binding protein
cDNA	complementary DNA
CHIP	HSC70-interacting protein
c-jun	Jun Oncogene
CMV	Zytomegalie-Virus
CP	Core Protein
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cyclic AMP response element-binding protein
CRP	C-reaktives Protein
CsA	Ciclosporin A
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DLK	Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase
DLK-1	DAP (Death-Associated Protein Kinase) Like Kinase family member

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLUT	Glukose-Transporter
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HIT	Hamster Insulinoma Tumor
HSP	Hitzeschockprotein
HWZ	Halbwertszeit
IAPP	Islet amyloid polypeptide
IB1/JIP	Islet-brain 1/JNK-interacting protein
IL	Interleukin
IL-1RAcP	IL-1R-accessory-Protein
IL-Ra	IL-1-Rezeptor-Antagonisten
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP	Immunpräzipitation
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-jun N-terminal kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basen
KIR	K ⁺ inward rectifier
LB	Luria Bertani
LZK	Leucine-Zipper-Bearing Kinase
MafA	Musculo-aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MLK	Mixed lineage kinase
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MUK	Mitogen-activated protein kinase upstream kinase
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIDDM	Nicht-Insulinabhängiger Diabetes mellitus
NO	Stickoxid
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
pH	Potentia Hydrogenii (pH-Wert)
PHR-1	PAM, Highwire, RPM-1
P-JNK	phosphoryliertes JNK
PKA	Proteinkinase A
POSH	Plenty of SH ₃
PPI	Proteaseinhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Regulatory Particle
RPM-1	Regulator of presynaptic morphology
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAPK	stressaktivierte Proteinkinasen
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
	Elektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
siRNA (RNAi)	small interfering RNA
sTNF α	soluble TNF α
SUR1	Sulphonylharnstoff-Rezeptor-1
SV-40	Simian-Virus-40
Tab.	Tabelle
TACE	TNF-alpha-converting enzyme
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tpl2	Tumor progression locus 2
TRAF	TNF-receptor-associated factor
Ub	Ubiquitin
UEV-3	E2 ubiquitin conjugating enzyme variant 3
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
ZAK	Zipper Sterile- α -Motif Kinase
ZPK	Leucine Zipper Protein Kinase

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnr.	Titel	Seite
1.1	Morphologie der adulten pankreatischen Langerhans-Insel	4
1.2	Einordnung der DLK in die MAPK-Signalkaskade	10
1.3	Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK	12
2.1	Aufbau der Transferkammer	42
3.1	Zelluläre DLK kann mit dem DLK-AK von Holzman et al. (1994) aus dem Betazell-Lysat immunpräzipitiert werden.	49
3.2	Die enzymatische Aktivität der DLK wird durch Behandlung mit TNF α gesteigert.	50-51
3.3	Abschätzung der Halbwertszeit der DLK in den HIT-T15-Zellen.	53
3.4	Die Reduktion der zellulären DLK durch siRNA führt zu einer Verminderung der JNK-Phosphorylierung.	55-56
3.5	Zelluläre DLK kann mit dem DLK-AK von Hirai et al. (2006) aus dem Betazell-Lysat immunpräzipitiert werden.	57
3.6	Unter Einwirkung des JNK-Inhibitors SP600125 bleibt die TNF α -induzierte Zunahme der Aktivität der DLK aus.	59
3.7	Die Reduktion der zellulären DLK durch siRNA führt zu einer Verminderung des Effektes von TNF α auf den Bcl-xL-Proteingehalt.	61-62
3.8	Die enzymatische Aktivität der DLK wird durch Behandlung mit IL-1 β zu den gewählten Zeitintervallen nicht gesteigert.	64-65
3.9	IL-1 β führt zu einer Zunahme der JNK-Phosphorylierung in den HIT-T15-Zellen.	67
3.10	Die Zytokine TNF α und IL-1 β führen zu einer Reduktion des DLK-Proteingehalts in den HIT-T15-Zellen.	69
3.11	Die Reduktion der DLK durch die Zytokine TNF α und IL-1 β wird durch Proteasom-Inhibition in den HIT-T15-Zellen vermindert.	71-72

Abbildungsnr.	Titel	Seite
3.12	Unter Behandlung mit Cycloheximid kommt es zu keiner Reduktion der DLK durch die Zytokine TNF α und IL-1 β in den HIT-T15-Zellen.	74
3.13	Der Effekt der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die DLK-Proteinmenge wird durch Expression Kinase-toter Mutanten in den HIT-T15-Zellen verhindert.	76
4.1	Auswirkung der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die DLK.	95

Tabellennr.	Überschrift	Seite
2.1	Pipettierschema der Transfektion von siRNA	30
2.2	Pipettierschema der METAFECTENE TM -Methode	31
2.3	Pipettierschema der Reagenzien	37
3.1	DLK-Degradation bei Inhibition des Proteasoms	71
3.2	DLK-Degradation bei Inhibition der Proteinsynthese	73
3.3	DLK-Degradation bei Kinase-toten Mutanten	76

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Überernährung sowie körperliche Inaktivität und die sich hieraus ergebende Adipositas betreffen heute einen immer größer werdenden Anteil der Weltbevölkerung, so dass diese Zustände bereits beginnen, Unterernährung und Infektionen als die wichtigsten Krankheitsursachen zu verdrängen. Schon eine zwischen 1983 und 1986 von der WHO in 39 europäischen Städten bzw. Zentren an Männern und Frauen zwischen 35 und 64 Jahren erhobene Studie schätzte, dass mehr als die Hälfte der Bevölkerung entweder übergewichtig (BMI 25-30kg/m²) oder adipös (BMI >30kg/m²) ist, und das mit steigender Tendenz; auch in den Entwicklungsländern Afrikas, Asiens und Südamerikas ist, einhergehend mit der zunehmenden Verwestlichung, ein Anstieg der Inzidenzen zu verzeichnen (Keil und Kuulasmaa 1989; Zimmet et al. 2001). Eine mit Übergewicht und Adipositas assoziierte Erkrankung, die durch diese Tendenz immer mehr in den Mittelpunkt rückt, ist der Diabetes mellitus Typ 2 (Lazar 2005). Im Jahr 2000 beliefen sich die Schätzungen für Menschen, die an Diabetes erkrankt sind, auf 171 Mio. weltweit (Wild et al. 2004). Es wird geschätzt, dass sich diese Zahl bis zum Jahr 2030 auf 366 Mio. Betroffene mehr als verdoppeln wird, wobei 298 Mio. davon in den Entwicklungsländern erwartet werden (Wild et al. 2004). Dabei sind 90% der Diabetiker an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt.

Der Hauptteil der Erkrankungen unterliegt einer multifaktoriellen Pathogenese; nur 10 % können auf eine monogenetische Genese wie den Maturity-onset diabetes of the young (MODY) zurückgeführt werden (Stumvoll et al. 2005). Die medizinische und sozioökonomische Tragweite dieser Erkrankung wird u. a. durch die mit ihr assoziierten Komplikationen hervorgerufen, die größtenteils die Gefäße betreffen und zu Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und kardiovaskulären Erkrankungen führen (King 2008; Nichols et al. 2008). Die Amerikanische Vereinigung der klinischen Endokrinologen veröffentlichte 2007 Daten, aus denen hervorgeht, dass 58% der Patienten mit Diabetes mellitus mindestens eine dieser Komplikationen aufweisen, 25% sogar zwei oder mehr (Nichols et al. 2008).

1.1.2 Physiologie der Glukosehomöostase

Die Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas sezernieren unter physiologischen Bedingungen in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel das Peptidhormon Insulin. Oral aufgenommene Glukose wird nach der Resorption im Magen-Darm-Trakt von den Betazellen über den insulinunabhängigen Glukose-Transporter-2 (GLUT2) aufgenommen, durch das Enzym Glukokinase phosphoryliert und im Zellstoffwechsel durch Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette zu dem Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) metabolisiert (vgl. Rassow et al. 2006). Neben der Lieferung der nötigen Energie führt die Änderung des Verhältnisses von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) zur Aktivierung des Sulphonylharnstoff-Rezeptor-1 (SUR1; engl. für sulfonylurea receptor 1), einer Untereinheit der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (KIR; engl. für K⁺ inward rectifier). Die Bindung von ATP an SUR1 bewirkt die Schließung der KIR und führt so durch eine Veränderung des Membranpotentials zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanälen. Durch den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird die Freisetzung einer dem Blutglukosespiegel angepassten Menge von Insulin aus Speicher-Granula hervorgerufen (Stumvoll et al. 2005). Neben der Glukose als stärkstem Effektor führen auch Aminosäuren und Fettsäuren zu einer Insulin-Sekretion, deren Ausmaß darüber hinaus zusätzlich von neuronalen (u. a. sympathischem und parasympathischem Tonus) und hormonellen Faktoren, wie z.B. Glukagon, Glukagon-like Peptide-1 (GLP-1), Gastric inhibitory polypeptide (GIP) und Somatostatin, moduliert wird (Bell und Polonsky 2001).

Im peripheren Gewebe führt die Bindung des sezernierten Insulins an den Insulinrezeptor, der zu der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase gehört, zur Aktivierung der intrazellulär gelegenen Kinase-Domäne durch Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten außerhalb der Kinase-Domäne. Diese Tyrosin-Reste dienen als Bindungsstellen für Phosphotyrosin-bindende Proteine wie das Insulinrezeptorsubstrat (IRS), das für die metabolischen Funktionen des Insulins essentiell ist. Die Senkung des Blutglukosespiegels zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase wird durch verschiedene Mechanismen erreicht: die Reduktion der Glukoseabgabe aus der Leber, die Zunahme der Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe durch Einbau des Glukose-Transporter-4 (GLUT 4) in die Plasmamembran und durch die Stimulation der Fettsäuresynthese bei gleichzeitiger Suppression der Freigabe von Fettsäuren aus dem Fettgewebe (Stumvoll et al. 2005).

1.1.3 Pathogenese des Diabetes mellitus – Reduktion der Betazellmasse als zentraler Mechanismus in Typ 1 und Typ 2

Für die Fähigkeit der Betazellen, in Abhängigkeit von ihrer Funktion und ihrer Masse adäquate Mengen an Insulin zu sezernieren, haben Finegood et al. (1995) ein mathematisches Modell entwickelt. Aufgrund von Untersuchungen an der Sprague-Dawley-Ratte beschreiben sie die Veränderung der Betazellmasse als dynamischen Prozess zur Regulation eines euglykämischen Zustandes, bei dem zu jeder Zeit ein Gleichgewicht zwischen Betazell-Replikation und -Apoptose besteht und das endokrine Pankreas als ein sich langsam regenerierendes Gewebe betrachtet wird (Finegood et al. 1995). Bei der Apoptose kommt es zu Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, einer Auflösung der Zellmembran in Vesikel und einem Abbau der zellulären Bestandteile in eben diesen (Wyllie et al. 1980). Diese sog. apoptotischen Körperchen werden von Makrophagen phagozytiert, so dass keine inflammatorische Reaktion stattfindet (Rath und Aggarwal 1999; Assuncao Guimaraes und Linden 2004). Bei Patienten mit Diabetes mellitus kommt es zu einer Dysregulation der Balance von Replikation und Apoptose. Im Allgemeinen werden zwei Typen dieser Erkrankung unterschieden. Beim Diabetes mellitus Typ 1 kommt es im Rahmen einer Autoimmunerkrankung zur Zerstörung der Insulin-produzierenden Betazellen innerhalb der Langerhans'schen Inseln durch infiltrierende T-Zellen (Insulitis). Bei den meisten Patienten können autoreaktive Antikörper (AK) gegen die Inseln festgestellt werden, wie zytoplasmatische Inselzell-AK (ICA), Glutamatdecarboxylase-AK (GADA), Tyrosinphosphatase-2-AK (IA-2), sowie Insulin-Auto-AK (IAA). Die Erkrankung manifestiert sich, wenn die Betazellmasse um etwa 80% reduziert ist, wobei es durch die Zerstörung letztendlich zu einem absoluten Insulinmangel kommt (Atkinson und Eisenbarth 2001).

Beim Diabetes mellitus Typ 2 handelt es sich zunächst um einen relativen Insulinmangel, verursacht durch eine periphere Insulinresistenz. Eine allgemeine Ursache dieser Insulinresistenz, die sich in einer verminderten biologischen Wirkung des Insulins auf die Skelettmuskulatur, die Leber und das Fettgewebe widerspiegelt, konnte bislang nicht identifiziert werden (Stumvoll et al. 2005). Durch die verminderte Wirkung des Insulins kommt es zu einer vermehrten Zirkulation von Fettsäuren und zu einer Hyperglykämie, die in einem Feedback-Mechanismus wiederum die Insulinresistenz verstärken und initial zu einer kompensatorischen Zunahme der Betazellmasse mit Hyperinsulinämie führen. Die Hyperinsulinämie kompensiert zunächst den vermehrten metabolischen Überfluss, der bei Adipositas, aber auch bei anderen Erkrankungen wie Morbus Cushing oder Akromegalie

auftreten kann. Zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 kommt es mit zunehmender Dekompensation der Betazellen, in deren Folge sich der Körper nicht mehr an den metabolischen Überfluss adaptieren kann (Butler et al. 2003; Rhodes 2005; Stumvoll et al. 2005).



Abb. 1.1: Morphologie der adulten pankreatischen Langerhans-Insel (modifiziert nach Rhodes 2005, S. 381). In normalem Zustand, beim Vorliegen einer nicht-diabetischen Adipositas und bei Diabetes mellitus Typ 2. Die endokrinen Zellen machen etwa 1% der Zellen des gesamten Pankreas aus. In normalen Inseln repräsentieren die Betazellen (braun dargestellt) mit etwa 70% den größten Anteil der endokrinen Zellen. Bei nicht-diabetischer Adipositas kommt es zu einer Zunahme der Anzahl sowie der Größe der Inseln, wobei die Betazellen nahezu 99% der endokrinen Zellen ausmachen. Mit zunehmender Entgleisung der Stoffwechsellage kann es beim Diabetes mellitus Typ 2 zu einer Abnahme sowie Dysorganisation der endokrinen Inseln kommen. Dabei ist der Anteil der Betazellen an den endokrinen Zellen reduziert und Amyloid Plaques (violett dargestellt) können im Inselbereich dominieren.

Am Modell der Sandratten (*Psammomys obesus*) konnte mit der Progredienz des durch eine hochkalorische Ernährung induzierten Diabetes eine erhöhte Apoptose-Rate mit daraus resultierender Zerstörung der Betazell-Architektur gezeigt werden (Donath et al. 1999). Dieses Ergebnis bestätigte sich in Studien an Patienten, die eine gestörte Glukosetoleranz entwickelt hatten oder an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren: An den autopsierten Pankreata konnte ein Defizit der relativen Betazellmasse von 40-63% im Vergleich zu Pankreata von nicht-diabetischen Patienten mit ähnlichem Gewicht (weight-matched) gezeigt werden. Während die Rate der Betazell-Replikation bei den Patienten mit Nicht-Insulinabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) in den verschiedenen Gewichtsgruppen vergleichbar blieb (nicht-diabetisch adipös: Replikations-Rate erhöht), war eine Erhöhung der Frequenz der Apoptose der Betazellen zu verzeichnen (Butler et al. 2003). Ursächlich wird der bestehenden Hyperglykämie und Hyperlipidämie große Bedeutung beigemessen. Als Konsequenz aus dem chronisch erhöhten Glukosemetabolismus der Zelle kommt es u. a. zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; Ihara et al. 1999; Sakuraba et al. 2002; Evans et al. 2003), sowie zu chronisch auf zytotoxische Level erhöhten Spiegeln

intrazellulären Calciums (Bjorklund et al. 2000; Grill und Bjorklund 2001; Donath und Halban 2004). Beide Faktoren können zu einer Aktivierung von Stress-Proteinkinasen (JNK und p38) in Betazellen führen (Kaneto et al. 2002 und 2005; vgl. Kap. 1.3). Die durch Hyperglykämie induzierte nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen, gemessen an Glykohämoglobin (HbA_{1c}), trägt zu den vaskulären Komplikationen des Diabetes bei und korreliert mit der Höhe der Konzentration von ROS (Leinonen et al. 1997). Ebenfalls eine proapoptotische Rolle könnten die Ablagerungen des islet amyloid polypeptide (IAPP) in Form von Amyloid-Plaques spielen, die in den Langerhans'schen Inseln von Typ 2-Diabetikern identifiziert werden konnten (Kahn et al. 1999; Sakuraba et al. 2002; vgl. Abb. 1.1). Durch die Hyperlipidämie kommt es zu einer Akkumulation von Lipiden in den Betazellen, die über Induktion der inducible nitric oxide synthase (iNOS) zur Apoptose führen können (Unger und Orci 2001). Auf den Einfluss der Zytokine in der Pathogenese des Diabetes wird in Kapitel 1.2 näher eingegangen. Bei den zahlreichen Faktoren, die in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle spielen, sind die intrazellulären Signaltransduktions-Mechanismen, die zur Apoptose der Betazellen führen, bislang noch weitestgehend ungeklärt.

1.2 Die Zytokine TNF α und IL-1 β und ihre Signalwege

Wie bereits aufgeführt, scheint Apoptose die vorrangige Form des Betazell-Todes in Tiermodellen und bei Menschen mit Diabetes zu sein. Die proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) und Interleukin-1-beta (IL-1 β) sind dabei wichtige pathogene Effektoren, die - vor allem in Kombination - zu massiver Apoptose führen und sowohl in die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 als auch des Typ 2 involviert sind (Pukel et al. 1988; Andersen et al. 2000). Lange Zeit wurde das Fettgewebe als ein auf die Fettspeicherung limitiertes, passives Gewebe angesehen. Mehrere Untersuchungen zeigen jedoch eine endokrine Aktivität des Fettgewebes, die zum Teil lokal (auto-/parakrin) begrenzt bleibt, aber durch Sekretion in den Kreislauf auch den Organismus erreicht. Zytokine, die freigesetzt werden, sind u. a. TNF α (Hotamisligil et al. 1993 und 1995; Kern et al. 1995 und 2001; Dandona et al. 1998), IL-6 (Fried et al. 1998; Kern et al. 2001), IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra; Meier et al. 2002) sowie das Hormon Leptin (Zhang Y et al. 1994; Maedler et al. 2004). TNF α wird primär als Transmembran-Protein vom Typ 2 produziert und erst durch die Metalloprotease TNF-alpha-converting enzyme (TACE) durch proteolytische Spaltung in die lösliche Form (sTNF α) umgewandelt (Black et al. 1997). Bei Adipositas

kommt es zu einer vermehrten Sekretion von TNF α durch das Fettgewebe, wobei die Plasmakonzentration mit dem BMI des Patienten korreliert (Kern et al. 1995 und 2001; Hotamisligil et al. 1993 und 1995; Dandona et al. 1998; Hauner et al. 1998). Eine erhöhte Konzentration von TNF α ist an der Entwicklung der Insulinresistenz in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt (Plomgaard et al. 2007). Ein intrazellulärer Mechanismus stellt dabei die Phosphorylierung des IRS-1 an Ser-307 dar. Diese Phosphorylierung schränkt die Interaktion des IRS-1 mit dem Insulinrezeptor und weiteren Signaltransduktionsmolekülen ein (Aguirre et al. 2000 und 2002). Ein wichtiger Mediator der mit der Phosphorylierung des IRS-1 verbundenen Signaltransduktion wurde in JNK entdeckt (Hirosumi et al. 2002; Lee et al. 2003). Homozygote Mutanten einer TNF α ^{-/-}-Knock-out-Maus konnten die wichtige Funktion von TNF α für die Adipositas-induzierte Insulinresistenz belegen (Uysal et al. 1997). TNF α wirkt an zwei unterschiedlichen Rezeptoren, TNF-R1 (p60) und TNF-R2 (p80) (Wajant et al. 2003). TNF-R1 wird auf allen Zellen exprimiert, während die Expression des TNF-R2 auf Zellen des Immunsystems sowie Endothelzellen begrenzt bleibt (Wajant et al. 2003). Die beiden Rezeptoren haben ähnliche extrazelluläre Domänen, die intrazelluläre Signalübertragung ist jedoch unterschiedlich (Rath und Aggarwal 1999). Nach Bindung des sTNF α an den TNF-R1 wird der Komplex internalisiert (Mosselmans et al. 1988; Higuchi und Aggarwal 1994), so dass es durch Abbau in den Lysosomen möglich wird, die Wirkung des TNF α zu beenden. Allerdings scheint diese Internalisierung auch erforderlich für die Stimulation von einigen Signalwegen, wie den der JNK und für die Induktion der Apoptose, während andere Signaltransduktionen, wie die über die Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) und NF κ B, unabhängig von der Internalisierung ablaufen (Schutze et al. 1999).

IL-1 β wird als inaktives Precursor-Protein synthetisiert und befindet sich zum größten Teil im Zytosol (Dinarello 2005). Auch für IL-1 β konnte eine Beteiligung in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden: Durch Hyperglykämie kommt es zu einer vermehrten IL-1 β -Bildung und Sekretion durch die Betazellen in humanen Pankreata von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sowie in Sandratten (*Psammomys obesus*), die einer kalorienreichen Ernährung unterzogen wurden (Maedler et al. 2002). Bei kurzer Inkubation von Betazellen führt IL-1 β zu einer Zunahme der Insulin-Sekretion, bei niedrigen Konzentrationen sogar zur Betazell-Proliferation; eine länger andauernde Inkubation jedoch führt zu einer Betazell-Dysfunktion und Apoptose (Spinas et al. 1988; Hammonds et al. 1990; Maedler et al. 2002 und 2006). Eine erhöhte Leptin-Konzentration vermindert den protektiven IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra), der in den Pankreata nicht-diabetischer Patienten

exprimiert wird, und führt ebenfalls zu einer vermehrten Betazell-Sekretion von IL-1 β (Maedler et al. 2004). Leptin wird vorrangig im Fettgewebe exprimiert, wobei sich die Sekretion proportional zur Fettmasse verhält (Zhang Y et al. 1994). Adipositas führt damit neben der zumeist bestehenden Hyperglykämie auch über die vermehrte Bildung von Leptin und die konsekutive Dysbalance von IL-1 β und IL-1Ra zu einer gestörten Betazell-Funktion mit folgender Betazell-Apoptose (Maedler et al. 2004). Die Bedeutung von IL-1 β für die Pathogenese des NIDDM konnte in einer Studie mit Patienten, die sich für 13 Wochen einer medikamentösen Therapie zur Blockade des Interleukins durch einen IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) unterzogen, belegt werden: Die Nüchtern-Blutzuckerwerte und der HbA_{1c}-Wert konnten gesenkt werden, es kam zu einer Abnahme der Entzündungsmarker CRP und IL-6 und die sekretorische Funktion der Betazellen verbesserte sich (Larsen et al. 2007). Der IL-1-Rezeptor ist ein Komplex aus zwei Ketten, dem IL-1R-Typ I (IL-1RI) und dem IL-1R-accessory-Protein (IL-1RAcP; Boraschi und Tagliabue 2006). Liganden an diesem Rezeptor sind IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra (Dinarello 1998 und 2007). Nach Bindung eines agonistischen Liganden dimerisiert der IL-1R und die darauf folgende Konformationsänderung ermöglicht die Rekrutierung von Molekülen des Signalweges (Akira und Takeda 2004).

Die intrazelluläre Signaltransduktion von TNF α und IL-1 β unterscheidet sich in den aktivierten Signalkomplexen, konvergiert jedoch bei NF κ B und den MAPK, deren Protein-Protein-Interaktionen mit dem intrazellulären Anteil des jeweiligen Rezeptors durch die in der Phylogese konservierten TNF-receptor-associated factor-(TRAF)-Proteine vermittelt wird (Wajant et al. 2001; Mandrup-Poulsen 2003). Sowohl NF κ B, als auch die MAPK können über die Regulation von Transkriptionsfaktoren in den Zytokin-induzierten Zelltod involviert sein (Giannoukakis et al. 2000; Ventura et al. 2006). Über JNK, die MAPK, die durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wird, werden zelluläre Proteine wie die Komponenten des Activator-Protein-1-Transkriptions-Faktor-Komplexes (AP-1), c-Jun und ATF-2 phosphoryliert (Su und Karin 1996). Diese Phosphorylierung führt zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität des AP-1 (Ip und Davis 1998). Die Rolle der AP-1 Transkriptionsaktivität ist noch unklar. Unter anderem wird durch die Zytokin-induzierten Signalwege die Expression der inducible nitric oxide synthase (iNOS) geregelt, die zu vermehrter Produktion von zellschädigendem Stickoxid (NO) führt (Eizirik et al. 1996; Heitmeier et al. 2001).

1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

1.3.1 Allgemeine Prinzipien der Signaltransduktion über MAPK

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen sind phylogenetisch konservierte, in Kaskaden verschaltete Signalmechanismen, die in allen Eukaryoten existieren und rezeptorvermittelt unterschiedliche zelluläre Aktivitäten wie Mitose, Apoptose, Motilität und Metabolismus regulieren (Yasuda et al. 1999; Gallo und Johnson 2002). Die MAPK-Kaskade besteht aus drei aufeinander folgenden Kinase-Familien, der MAPKKK (Syn. MAP3K), der MAPKK (Syn. MAP2K) und der MAPK, wobei auf diesem durch Phosphorylierung regulierten mehrstufigen Signalweg Informationen weitergeleitet, amplifiziert und integriert werden (Levchenko et al. 2000; Weston und Davis 2007). An letzter Stelle dieser Kaskade steht die MAPK, welche durch Phosphorylierung durch die zweite Instanz der Kaskade, die MAP2K, aktiviert wird. Die MAP2K wird ihrerseits durch Phosphorylierung durch das erste Mitglied dieser Kaskade, die MAP3K, aktiviert (Widmann et al. 1999). Die Aktivierung der MAP3K scheint durch unterschiedliche Mechanismen zu erfolgen; u. a. reguliert durch Membrandepolarisation (Mata et al. 1996), spezifische MAP4K (Widmann et al. 1999), kleine GTP-Bindungsproteine wie z.B. Ras, Rac und Cdc42 (Gutkind 1998) oder Autophosphorylierung (Gallo et al. 1994; Mata et al. 1996). Nach bisherigem Kenntnisstand findet die MAPK-Kaskade-Reaktion im Zytosol statt, während die aktivierte MAPK unterschiedliche Zielproteine sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus phosphoryliert (Levchenko et al. 2000). Es finden sich jedoch Belege, dass auch MAP3Ks in den Kern translozieren können (Merritt et al. 1999; See et al. 2001; Wallbach 2010). Die MAPK-Signalkaskade wird von einer Vielzahl regulatorischer Mechanismen, die Dauer, Vielfältigkeit und Ausmaß der Signale betreffen, beeinflusst. Diese reichen von Gerüstproteinen und verschiedenen Kompartimenten über Proteinphosphatasen zu zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. Ubiquitinierung und proteasomale Degradation der Komponenten und Substrate (Laine und Ronai 2005).

Zu den MAP3K gehören alle bekannten Mixed lineage kinases (MLKs), eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, von denen acht in Säugetieren identifiziert und auf Basis der Organisation ihrer Domänen und der Ähnlichkeiten ihrer Sequenzen in drei Subfamilien unterteilt wurden (Handley et al. 2007):

1. MLKs; MLK1-4 (Dorow et al. 1993; Gallo et al. 1994; Ing et al. 1994)

2. Dual-leucine-zipper-bearing kinases; Dual-leucine-zipper-bearing kinases (DLKs) und Leucine-zipper-bearing kinase (LZK ; Holzman et al. 1994 ; Sakuma et al. 1997)
3. Zipper Sterile- α -Motif Kinases (ZAKs); ZAK α und ZAK β (Liu TC et al. 2000; Gotoh et al. 2001).

Alle acht MLKs enthalten eine Leucine-Zipper-Domäne, über die sie Homodimere formen können, die notwendig für eine Autophosphorylierung sind (Handley et al. 2007). Sie aktivieren die MAPK c-Jun N-terminal kinase (JNK) über zwischengeschaltete MAP2Ks (z. B. MKK7, MKK4; Gallo und Johnson 2002). Die MAP3K DLK kann sowohl das JNK-Modul als auch das p38-Modul aktivieren (Fan et al. 1996; vgl. Abb. 1.2). JNK (JNK1/2/3) und p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) gelten als stressaktivierte Proteinkinasen (SAPK), die durch Stimuli wie z.B. Hitzeschock, UV-Strahlung, proinflammatorische Zytokine, Hyperosmolarität, oxidativen Stress, sowie den Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin aktiviert werden (Kyriakis et al. 1994; Chang L und Karin 2001). Die Aktivierung kann über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen (und z. T. gegensätzlichen) zellulären Prozessen wie z.B. Apoptose, Differenzierung und Immunantwort führen (Kyriakis und Avruch 1996; Chang L und Karin 2001). Die MKK7 gilt als in-vitro- und in-vivo-Substrat der DLK; ein weiteres mögliches Substrat, die MKK4, gilt als umstritten (Fan et al. 1996; Fanger et al. 1997; Merritt et al. 1999). Beide MAP2Ks können JNK durch Phosphorylierung an Thr-183 und Tyr-185 aktivieren, wobei sie dabei nicht redundant fungieren, sondern z.B. durch unterschiedliche Präferenzen bei der Phosphorylierung verschiedene Funktionen im JNK-Signalweg ausüben (Tournier et al. 1999; Davis 2000; Liu J und Lin 2005). Auch hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheiden sich die MAP2Ks: MKK7 aktiviert selektiv nur JNK, während MKK4 zusätzlich p38 aktivieren kann (Derijard et al. 1995; Holland et al. 1997; Davis 2000).

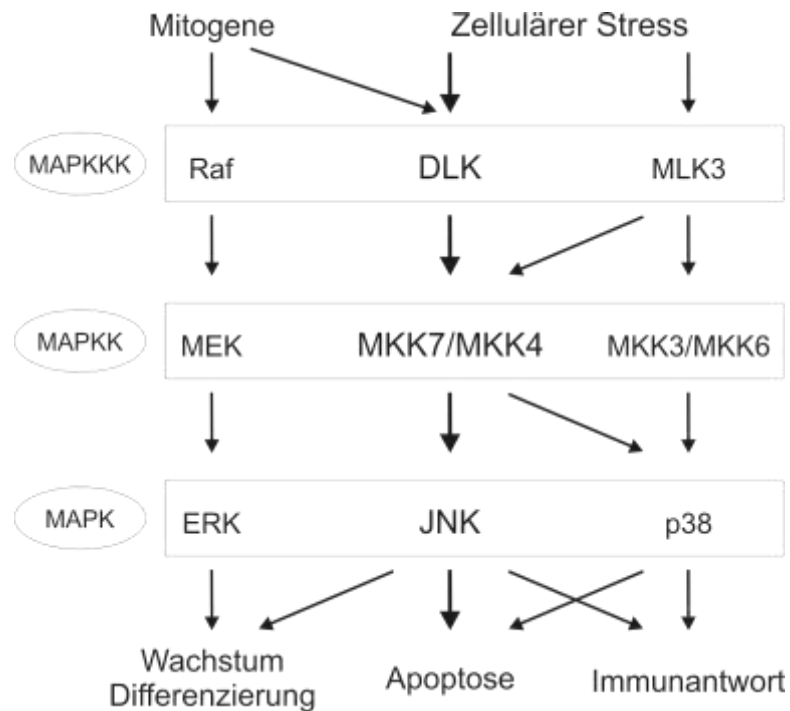


Abb. 1.2: Einordnung der DLK in die MAPK-Signalkaskade. Der MAPK- Signalweg ist in dieser Abbildung exemplarisch nur für einzelne Kinasen, Regulationsmechanismen und Substrate dargestellt. Die MAPK-Signalkaskade besteht aus einer MAPKKK, einer MAPKK und einer MAPK. Die MAPKKKs sprechen auf eine Reihe von extrazellulären Signalen, wie Mitogene und zellulären Stress an. Die aktivierten MAPKKKs können eine oder mehrere MAPKKs aktivieren, während die MAPKKs ihrerseits relativ spezifische Zielproteine (MAPKs) aufweisen. Die aktivierten MAPKs können Transkriptionsfaktoren, andere Kinasen, übergeordnete Regulatoren und andere regulatorische Enzyme, wie Phospholipase A2 phosphorylieren. Diese Zielproteine kontrollieren zelluläre Reaktionen, u. a. Wachstum, Differenzierung und Apoptose (Kyriakis et al. 1994; Fan et al. 1996; Kyriakis und Avruch 1996; Mata et al. 1996; Garrington und Johnson 1999; Chang L und Karin 2001; Gallo und Johnson 2002).

1.3.2 Gerüstproteine in der Signalkaskade

Die Regulation der Signalkaskade wird u. a. durch Gerüstproteine wie plenty of SH3s (POSH) und Islet-brain 1/JNK-Interacting Protein-1 (IB1/JIP-1) gewährleistet, die durch Formung von sog. Signalkomplexen die Bindungspartner in spezifischen subzellulären Kompartimenten oder zu spezifischen Substraten lokalisieren (Whitmarsh et al. 1998; Xu et al. 2003; Nihalani et al. 2001 und 2003). JIP-1 integriert die Proteinkinasen DLK, MKK7 und JNK als Bestandteile des MAPK-Signalweges (Whitmarsh et al. 1998; Whitmarsh und Davis 1998). Dabei binden DLK und MKK7 an das C-terminale Ende des JIP-1-Proteins, während die Bindungsdomäne für JNK im N-terminalen Anteil liegt (Whitmarsh et al. 1998). Bei der DLK besteht unabhängig von der Kinase-Aktivität eine direkte Assoziation mit JIP-1 in der für eine JNK-Aktivierung erforderlichen N-terminalen Region (Nihalani et al. 2000). Die DLK wird

dadurch in ihrem monomeren, unphosphorylierten und katalytisch inaktiven Status gehalten (Nihalani et al. 2001). Durch einen adäquaten Stimulus phosphoryliert JNK JIP an Thr-103, wodurch die Bindungsaffinität des Gerüstproteins für JNK weiter zunimmt, während sie für die DLK gemindert wird (Nihalani et al. 2003). Damit fördert JNK die Dissoziation der DLK vom JIP-1, wodurch es zur Dimerisierung und Aktivierung dieser Kinase (vgl. Kap. 1.4) mit nachfolgender Aktivierung von JNK über MKK7 kommt. Somit verhindert der JIP-1-Komplex zum einen die spontane DLK-Aktivierung, zum anderen führt die Dissoziation der DLK zur Signalamplifikation im MAPK-Signalweg (Handley et al. 2007).

Eine hohe Expression an JIP-1 konnte in den Betazellen des Pankreas nachgewiesen werden (Bonny et al. 1998) und könnte eine wichtige Funktion in der Pathogenese des Diabetes mellitus haben: Die Reduktion des Gerüstproteins führt zu einer Verminderung der Expression der mRNA von SLC2A2 (kodierend für GLUT2) und INS (kodierend für Insulin; Waeber et al. 2000). Des Weiteren zeigt sich bei einer Zytokin-induzierten Verminderung von JIP eine gesteigerte Apoptoserate in Verbindung mit einer Zunahme der JNK-Aktivität (Haefliger et al. 2003), aber auch unabhängig vom JNK-Signalweg (Ling et al. 2003).

1.4 Die Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase

Die Dual-leucine-zipper-bearing kinase (DLK), in der humanen Genom-Nomenklatur als MAP3K12 aufgelistet, ist das Homolog der humanen Leucine zipper protein kinase (ZPK) (Reddy und Pleasure 1994) in Mäusen; entsprechend existieren weitere Homologe wie die Mitogen-activated protein kinase upstream kinase (MUK) in Ratten (Hirai et al. 1996), DAP (Death-associated protein kinase) like kinase family member (DLK-1) in *Caenorhabditis elegans* (Nakata et al. 2005) und Wallenda in *Drosophila melanogaster* (Collins et al. 2006). Die Erstbeschreibung der DLK erfolgte durch Holzman et al. (1994), die bei der Untersuchung von in embryonalen Mäusenieren entwicklungsabhängig exprimierten Proteinkinasen die cDNA einer bis dahin unbekannt Proteinkinase isolierten. Bei der Sequenzierung wurde ein aus 888 Aminosäuren (AS) bestehendes Polypeptid identifiziert, das - abweichend von einem errechneten Molekulargewicht von 96kDa - unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 130kDa aufweist. Das Protein besteht aus einer katalytischen Domäne, deren Primärstruktur derjenigen von Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen ähnelt, wobei die DLK funktionell als Serin/Threonin-Kinase anzusehen ist (Gallo et al. 1994; Holzman et al. 1994; vgl. Abb. 1.3). Gefolgt wird diese katalytische

Domäne von zwei α -Helices formenden Leucin/Isoleucin-Zipper Motiven, die durch eine kurze Aminosäuresequenz getrennt werden. Am N- und C-terminalen Ende weist das Protein Glycin- und Prolin-reiche Domänen auf, die für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind (Holzman et al. 1994; vgl. Abb. 1.3). Für die DLK-Aktivität ist eine Homodimerisation erforderlich, die durch die Interaktion zweier Leucine-Zipper erfolgt; über diese Leucine-Zipper-Domänen werden keine Heterodimere mit anderen MLK-Proteinen gebildet (Nihalani et al. 2001). Interaktionen der DLK mit der Leucine-zipper-bearing kinase (LZK) wurden zwar beobachtet, waren aber am N-terminalen Ende der DLK lokalisiert und schienen auf einem intermediären Protein zu basieren; eine direkte Bindung konnte nicht gezeigt werden (Nihalani et al. 2000).

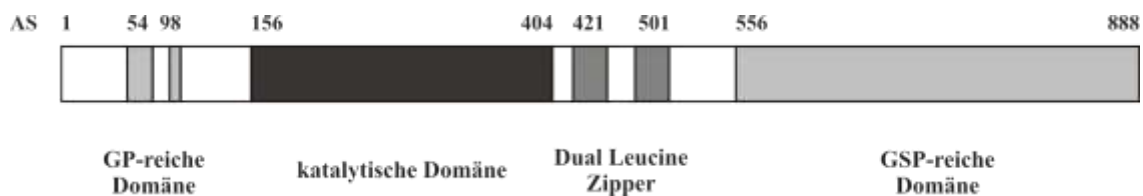


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Primärstruktur der DLK (nach Holzman et al. 1994, S. 30813). Die DLK besteht aus 888 AS. Die katalytische Domäne weist Ähnlichkeiten sowohl zu Serin/Threonin- als auch Tyrosin-Proteinkinasen auf. C-terminal der katalytischen Domäne befinden sich zwei Leucin/Isoleucin-Zipper (LZ), die durch eine kurze AS-Region getrennt werden. Am N-terminalen Ende der DLK liegt eine Glycin- und Prolin-reiche Domäne (GP) und am C-terminalen Ende eine Glycin-, Serin- und Prolin-reiche Domäne (GSP).

Für die Aktivierung der katalytischen Funktion der DLK ist die Phosphorylierung an Serin und Threonin erforderlich (Holzman et al. 1994; Mata et al. 1996), möglicherweise aber auch eine Src-abhängige Phosphorylierung an Tyrosin (Daviau et al. 2009). In neuronalen und glialen Zellen konnte die Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus der DLK von der Membrandepolarisation und der hieraus folgenden Aktivierung von Calcineurin nachgewiesen werden (Mata et al. 1996). Calcineurin ist eine Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase (Klee et al. 1979; Rusnak und Mertz 2000). Die selektive Inhibition von Calcineurin durch die Immunsuppressiva Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506; Liu J et al. 1991) führt zu einer Aktivierung der DLK (Mata et al. 1996; Plaumann et al. 2008). Des Weiteren konnte unter Behandlung von HIT-T15-Zellen mit den genannten Immunsuppressiva eine DLK-abhängige Zunahme der JNK-Aktivität nachgewiesen werden (Oetjen et al. 2006; Plaumann et al. 2008). Unabhängig von einer Phosphorylierung durch aktivierende Kinasen (Fan et al. 1996) bzw. der Abhängigkeit von der Membrandepolarisation, scheint die DLK einer Autophosphorylierung durch Dimerisation zu unterliegen, sobald sie von dem Gerüstprotein JIP-1 dissoziiert (Mata et al. 1996; Nihalani

et al. 2000 und 2001; Handley et al. 2007; vgl. Kap. 1.3.2). Unter basalen Bedingungen liegt die DLK sowohl phosphoryliert, als auch dephosphoryliert vor (Mata et al. 1996).

Die DLK zeigt keine ubiquitäre Expression, sondern bleibt während der embryonalen Entwicklung auf neuronales Gewebe begrenzt und in adulten Stadien auf Gewebe hohen Differenzierungsgrades und geringer Proliferation; unter anderem im Nervensystem, in der Leber, im Pankreas, in der Niere, im Hoden und in der Haut (Holzman et al. 1994; Blouin et al. 1996; Nadeau et al. 1997; Hirai et al. 2006; Oetjen et al. 2006). Abhängig vom untersuchten Zelltyp ist die DLK subzellulär mit der Plasmamembran und zytosolischen Kompartimenten, u. a. dem Golgi-Apparat assoziiert oder auch entlang der Mikrotubuli lokalisiert (Mata et al. 1996; Douziech et al. 1999; Hirai et al. 2002) und akkumuliert unter Behandlung mit den Zytokinen TNF α und IL-1 β in HIT-T15-Zellen im Zellkern (Wallbach 2010).

Aufgrund der Vielseitigkeit der DLK sind ihre Regulationsmechanismen in den Zellen trotz der scheinbar einfachen Architektur des MAPK-Signalweges noch weitgehend ungeklärt (Kyriakis und Avruch 1996). Verschiedene Ansätze befassen sich mit dieser Problematik: Die Regulation der Signalkaskade kann u. a. durch Gerüstproteine gewährleistet werden (vgl. Kap. 1.3.2), weiterhin konnte eine posttranslationale Modifikation durch Ubiquitinierung und proteasomale Degradation der aktivierten DLK nachgewiesen werden (Daviau et al. 2006; Po et al. 2010). Eine weitere Modifikation ist die Transglutaminase-vermittelte DLK-Oligomerisation, die die Kinase-Aktivität steigert und die Zellen für Apoptose-induzierende Stimuli sensibilisiert (Robitaille et al. 2004 und 2008). Zur Spezifizierung der Wirkung der DLK können auch interagierende Proteine einen Beitrag leisten, wie z. B. das E2 ubiquitin conjugating enzyme variant 3 (UEV-3), das durch Interaktion mit der untergeordneten MAPK p38 zu deren Aktivierung beiträgt oder die Substrate der MAPK limitiert (Trujillo et al. 2010). Des Weiteren kann die subzelluläre Lokalisation der DLK, deren Kernerkenntnissequenz erst kürzlich identifiziert wurde (Wallbach 2010), Auswirkungen auf die spezifischen Reaktionen der Zellen auf unterschiedliche Stimuli haben (Mochly-Rosen 1995; Raman et al. 2007).

Die DLK nimmt zellulär eine wichtige Funktion ein, da sie die durch Membrandepolarisation sowie die durch die cAMP-sensitive Proteinkinase A induzierte transkriptionelle Aktivität des cyclic AMP response element-binding protein (CREB) inhibiert (Reddy et al. 1999; Oetjen et

al. 2006). Dieser Transkriptionsfaktor ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion, da er an das Insulingen bindet und es aktiviert (Oetjen et al. 1994 und 2003), die Betazellapoptose verhindert und das Überleben der Betazellen u. a. durch Induktion von IRS-2 fördert (Withers et al. 1998; Jhala et al. 2003). Die Beteiligung der DLK an Apoptose-induzierenden Signalwegen, v. a. über die MAPK JNK, konnte bereits in neuronalen Zellen (Xu et al. 2001; Chen et al. 2008), in Fibroblasten (Robitaille et al. 2008) und auch in den pankreatischen Betazellen (Plaumann et al. 2008) nachgewiesen werden. Die grundlegende Bedeutung der DLK für biologische Prozesse zeigt sich in homozygoten Knock-out-Mäusen (DLK^{-/-}); diese entwickeln sich zunächst während der Embryonalentwicklung ohne Auffälligkeiten, sterben jedoch perinatal (Hirai et al. 2006).

1.5 Fragestellung

In eukaryoten Zellen existieren viele MAPK-Signalwege, die durch unterschiedliche Stimuli rekrutiert werden, so dass die Zelle koordiniert auf viele verschiedene Reize reagieren kann. Dabei ist die Regulation der MAP3Ks noch weitgehend ungeklärt (Kyriakis und Avruch 2001). Die MAP3K DLK ist eine wichtige Komponente für die Regulation des programmierten Zelltodes (Xu et al. 2001; Plaumann et al. 2008; Robitaille et al. 2008), und damit eventuell auch für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2, die letztlich auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellregeneration in den Betazellen des Pankreas zurückzuführen ist (Finegood et al. 1995). Dabei greift die DLK verstärkend in zwei den Zelluntergang fördernde Signalwege der Betazelle ein, nämlich neben der Aktivierung der JNK mit ihren proapoptotischen Einflüssen auch über CREB-Inhibition, wobei die antiapoptotische Funktion dieses Transkriptionsfaktors reduziert wird.

Des Weiteren konnte eine durch JNK-Aktivierung bedingte Beteiligung der Zytokine TNF α und IL-1 β an der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden (Hotamisligil et al. 1993 und 1995; Uysal et al. 1997; Maedler et al. 2002 und 2004), wobei bislang unklar ist, welche MAP3Ks im MAPK-Signalweg für die proinflammatorischen Stimuli maßgeblich sind.

In der vorliegenden Arbeit soll die Regulation der DLK durch die Zytokine TNF α und IL-1 β näher erforscht werden. Dabei soll die Frage beantwortet werden, wie sich die genannten Zytokine auf die enzymatische Aktivität der DLK auswirken. Des Weiteren soll geklärt werden, welchen Einfluss eine Zytokin-Behandlung in Abhängigkeit von der Funktion der DLK als MAP3K auf die untergeordnete JNK und auf das Überleben der Zellen hat. Schließlich soll die durch Zytokin-Behandlung hervorgerufene Veränderung der DLK-Proteinmenge untersucht werden.

Diese Untersuchungen wurden in der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 mit Hilfe von Immunpräzipitationen mit folgenden in-vitro-Kinase-Assays, transienten Transfektionen und Immunoblot-Analysen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt
Agarose ultrapur	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	AppliChem, Darmstadt
Anisomycin	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
ATP	Sigma-Aldrich, München
[γ - ^{32}P] ATP (10 mCi/ml; spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Bisacrylamid	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
CaCl_2	Merck, Darmstadt
β - Casein	Sigma-Aldrich, München
CsCl	AppliChem, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, München
Ciclosporin A	Novartis, Basel, Schweiz
DMSO	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Entwicklerlösung	Kodak, Stuttgart
Ethanol abs.	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fixiererlösung	Kodak, Stuttgart
Glycerin (87%)	AppliChem, Darmstadt
β - Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München
Glycin	AppliChem, Darmstadt

Substanz	Bezugsquelle
H ₂ O (RNase frei, Aqua ad iniectabilia)	Braun, Melsungen
HCl	AppliChem, Darmstadt
Hepes	AppliChem, Darmstadt
IL-1 β	Biomol, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
KCl	AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lactacystin	Sigma-Aldrich, München
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
β - Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
METAFFECTENE™	Biontex, München
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaF	AppliChem, Darmstadt
NaOH	AppliChem, Darmstadt
Na-ortho-vanadat	Sigma-Aldrich, München
NP-40 (Igepal CA 630)	Fluka, Steinheim
Okadasäure	AppliChem, Darmstadt
Oligofectamine™	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem®	Invitrogen, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG 6000)	AppliChem, Darmstadt
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Protein-A-Agarose	Sigma-Aldrich, München
Saccharose (D+)	AppliChem, Darmstadt
SDS	AppliChem, Darmstadt
Sepharose CL4B	Sigma-Aldrich, München
SP600125 – JNK-Inhibitor II	Calbiochem-Merck, Darmstadt
TEMED	AppliChem, Darmstadt
TNF α	Biomol, Hamburg

Substanz	Bezugsquelle
Tris ultrapur	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Enzyme

Substanz	Bezugsquelle
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen <i>λ</i> -DNA/ <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin/EDTA-Lösung (aus Rinderpankreas)	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Medienbestandteile und Seren

Bestandteil	Bezugsquelle
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
Agar	GIBCO BRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Pepton	AppliChem, Darmstadt

2.4 Antibiotika

Substanz	Bezugsquelle
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin (10000 U/ml)-	Invitrogen, Karlsruhe

Substanz	Bezugsquelle
Streptomycin (10000 µg/ml)	

2.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung/ Medium	Bezugsquelle/Referenz
Bcl-xL	Kaninchen (polyklonal)	1:200 Blockingpuffer	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
CREB-Antiserum (R1090)	Kaninchen (polyklonal)	1:50000 Blockingpuffer	Habener (Boston, MA, USA)
DLK (gegen die 223 C- terminalen AS)	Kaninchen (polyklonal)	1:3000 – 1:5000 Blockingpuffer ~1:100 Lysispuffer	Holzman et al. 1994, Fan et al. 1996
DLK (m5F4)	Maus (monoklonal)	IP-Puffer ~1:75	Hirai et al. 2006
GAPDH (FL-335)	Kaninchen (polyklonal)	1:10000 Blockingpuffer	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MafA (BL1069)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 Blockingpuffer	Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA
Phospho- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9)	Maus (monoklonal)	1:1000 Blockingpuffer	Cell Signaling, Beverly, MA, USA
SAPK/JNK	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 BSA-Puffer	Cell Signaling, Beverly, MA, USA

Entsprechend der Spezies der verwendeten primären Antikörper, kamen beim immunologischen Nachweis von Proteinen (s. 2.16.3) als sekundäre Antikörper Anti-Kaninchenimmunglobulin- bzw. Anti-Mausimmunglobulin-Antikörper in der Verdünnung 1:10000 zum Einsatz.

2.6 Standardgrößenmarker für Gele

Um das Molekulargewicht von Proteinen bei der SDS-PAGE, bzw. die Fragmentlänge der DNA bei der Agarosegelelektrophorese, bestimmen zu können, wurden folgende Standards parallel mitgeführt:

Standard	Bezugsquelle
PageRuler (für 4-20% Tris-Glycin SDS-PAGE)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler TM 1 kb	Fermentas, Burlington, Kanada

2.7 Expressionsvektoren (Plasmid-DNA)

Plasmid	Bezugsquelle
DLKwt	Holzman et al. 1994
DLK K185A	Holzman et al. 1994
DLK S302A	In der Arbeitsgruppe hergestellt

Das Einbringen von speziell konstruierten Expressionsvektoren in eine Zelle erlaubt die Transkription und Translation des in den Vektor klonierten Gens. Die DLK-cDNA-Plasmide, die die Information für die Proteinkinase DLK enthalten, stehen unter der Kontrolle von CMV-Promotoren. Die DLK-cDNA umfasst 3401bp und wurde für pDLKwt in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) subkloniert und anschließend um die Nukleotidsequenz für ein N-terminales FLAG-Epitop aus acht AS zwischen AS 1 und 2 erweitert (Holzman et al. 1994). Die DLK K185A-Mutante entstand durch die Einführung einer Punktmutation in das DLKwt-Plasmid. Die Punktmutation bewirkt die Kodierung für Alanin und nicht wie beim Wildtyp für Lysin an Position 185 (AS), welche sich in der katalytischen Domäne befindet. Durch diese Veränderung kann die exprimierte DLK-Mutante ATP nicht mehr stabil binden und ist damit katalytisch inaktiv (Mata et al. 1996). Bei dem DLK S302A-Plasmid wurde eine Punktmutation an Position 302 (AS) eingefügt, wodurch an dieser Stelle für Alanin anstatt für Serin kodiert wird. Durch diese Punktmutation wird eine zur Aktivierung essentielle Phosphorylierungsstelle der DLK verändert (unveröffentlichte Ergebnisse der Abteilung).

2.8 Small interfering RNA (siRNA)

Primer Name/Sequenz	Bezugsquelle
MAP3K12MSS218523(3_RNAI) ACAUCUCGAAGUACACAUUGGGUGG	Invitrogen, Karlsruhe
Unspezifische RNAi (Kontroll-RNAi)	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Kit	Bezugsquelle
Bio-Rad Protein Assay -Bio Rad Reagenz	Bio-Rad, München
ECL™ Western Blotting Analysis System -Peroxidase-markierte Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-Immunglobulin- Antikörper (Spezies Ziege) -Entwicklerlösung 1 -Entwicklerlösung 2	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

2.10 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
6-well-plates (Flat Bottom für adhärenente Zellen)	Sarstedt, Nümbrecht
Bluecap (Cellstar®) (15ml und 50ml)	Greiner Bio-one, Solingen
Dialyseschläuche	GIBCO BRL, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml und 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Faltenfilter (2,2µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Kanülen (20 G)	Braun, Melsungen
Kunststoffküvetten (1 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

Produkt	Bezugsquelle
Petrischalen (10 cm)	Greiner Bio-One, Solingen
Pipettenspitzen (20µl-1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm (Hyperfilm™-ECL)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Spritzen (1 ml und 5 ml)	Braun, Melsungen
Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal)	Beckman, München
Whatmanpapier (3mm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturschalen (Falcon 15cm und 6cm)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.11 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
Aluminiumplatte (80x70mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav (Bioklav)	Schütt, Göttingen
Bakterieninkubator 37°C	Heraeus Sepatech, Langenselbold
Elektrophoresekammer (SE 250)	Hofer, San Francisco, USA Amersham
Mighty Small II (für 80x70mm Gele)	
Eraser	Raytest, Straubenhardt
Geiger-Müller-Zählrohr (LB122)	Berthold, Bad Wildbad
Gelkammer (für Agarosegele)	IBI, New Haven, USA
Geltrockner (Slab gel dryer Model SE 1160)	Hofer, San Francisco, USA
Glasplatte (80x70mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Horizontalelektrophoresekammer	IBI, New Haven, USA
Inkubator (Stericult 200)	Labotect, Göttingen
Kunststoffkamm (1,5mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Lichtmikroskop (invers, TMS)	Nikon, Düsseldorf
Magnetrührer (heizbar)	Schütt, Göttingen
Metallklammern	Jacob Maul GmbH, Bad König
Mikrowelle (Whirlpool)	Philips, Hamburg
pH-Meter	Schütt, Göttingen
PhosphorImager (BAS Reader 1800 II)	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
<i>Software (Aida 4.15)</i>	Raytest, Straubenhardt
PhosphorImager-Kassette (IEC 60406)	Rego x-ray, Augsburg

Gerät	Hersteller
PhosphorImager-Platte (BAS-IP MS 2325)	Fuji Photo Film, Tokyo, Japan
Pipettierhilfen (Pipetman)	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfen (Pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt
Platzhalter (1,5mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Quarzküvetten (1 cm)	Hellma, München
Rocky (rocking platform)	Biometra, Göttingen
Röntgenkassette (X-Omatic)	Kodak, Stuttgart
Rotator (3025)	GFL, Großburgwedel
Scanner (hp Scanjet 3770)	Hewlett-Packard, Böblingen
<i>Software (Quantity One Version 4.0)</i>	Bio-Rad, München
Schüttelinkubator (Innova 4300)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Spannungsgerät (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
SpeedVac (HetoVac)	Heto, Allerød, Dänemark
Sterile Werkbank (Lamin Air HB 2448)	Heraeus Instruments, Hanau
Sterile Werkbank (SteriGard Hood Class II Type A/B3)	Baker Company, Sanford, Maine
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer (Compact)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer (Techne Dri-block DB.2A)	Krannich, Göttingen
Transferkammer	Wissenschaftliche Werkstätten, Universität Göttingen
Transilluminator Biometra Ti1	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	Kindermann, Ochsenfurt/Main
Ultrazentrifuge (Beckman Ultrazentrifuge L5-65)	Beckman, München
Ultrazentrifugen-Rotor (Beckman 70,1 Ti-Rotor)	Beckman, München
UV-Spektralphotometer (UV-160)	Shimadzu, Duisburg
Verschweißapparat (Beckman tube sealer)	Beckman, München
Videokamera mit Videoprinter (Geldokumentationsanlage E.A.S.Y.)	Herolab, Wiesloch
Vortexer (Typ REAX 1DR)	Heidolph, Schwabach
Vortexer (VortexGenie2)	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Gerät	Hersteller
Wasserbäder	Köttermann, Hänigsen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Solingen
Zentrifuge (3200)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (5415 D)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (5417 R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2-21)	Beckman, München
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifugengefäße (50 ml und 250 ml)	Beckman, München
Zentrifugen-Rotor (Beckman JA-14 Rotor)	Beckman, München
Zentrifugen-Rotor (Beckman JA-20 Rotor)	Beckman, München

2.12 Sterilisationsverfahren

Sämtliche Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden bei 121°C und 1,5 Bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert.

2.13 Klonierung und Isolierung von Plasmid-DNA

2.13.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der apathogene Ampicillin-sensible E. coli-Stamm DH-5 α verwendet. Dadurch, dass die Bakterien während der logarithmischen Wachstumsphase mit eiskalter 50mM Calciumchlorid-Lösung (CaCl₂) behandelt wurden, konnten diese die Transformationskompetenz erlangen und auf diese Weise Fremd-DNA spontan aufnehmen (Dagert und Ehrlich 1979). Die Langzeitaufbewahrung der Bakterien erfolgte in CaCl₂-Lösung mit 15% (v/v) Glycerin bei -80°C in flüssigem Stickstoff. Es erfolgte eine Portionierung zu jeweils 100 μ l. Zum Kultivieren von transformierten Bakterien wurden LB-Agarplatten, hergestellt aus mit 1,5% (w/v) Agar versetztem LB-Medium, verwendet. Zur Aufbereitung der Agar-Platten wurde diese Suspension autoklaviert und anschließend auf 50°C abgekühlt. Im Anschluss wurde Ampicillin (50 μ g/ml) hinzugegeben, das noch flüssige Gemisch in 30-ml-Portionen auf 10-cm-Schalen verteilt und bei 4°C gelagert.

Medium, Antibiotika	Zusammensetzung
LB-Medium	10g Pepton 5g Hefeextrakt 10g NaCl <i>H₂O bidest ad 1000ml</i>
Ampicillin	Stammlösung: 50mg/ml in <i>H₂O bidest, sterilfiltriert</i> Endkonzentration: 50µg/ml
Chloramphenicol	Stammlösung: 40mg/ml in <i>99% Ethanol, frisch angesetzt</i> Endkonzentration: 200mg/l

2.13.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Die kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit 100ng der zu transformierenden DNA gemischt und anschließend für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C zur Induktion der DNA-Aufnahme folgte eine Abkühlung für zwei Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 500µl LB-Medium wurde dieses Gemisch für 1h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 200µl der Bakterien auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte mit einer abgeflamnten Pasteurpipette ausgestrichen und bei 37°C in einem Inkubator über Nacht inkubiert. Das im Nährboden enthaltene Ampicillin diente zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien: Es konnten nur diejenigen Bakterien wachsen und sichtbare Kolonien bilden, die mit Aufnahme des jeweiligen Plasmids die ebenfalls darauf enthaltene genetische Information für Beta-Lactamase und damit Ampicillin-Resistenz erworben hatten.

2.13.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Mit Hilfe der Maxi-Präparation (modifiziert nach Sambrook et al. 1989) kann reine, superhelikale Plasmid-DNA in größeren Mengen gewonnen werden, die später für transiente Transfektionen (s. 2.14.2) verwendet wird. Als Substrat dienten hierbei die transformierten und amplifizierten Ampicillin-sensiblen *E. coli* Stämme, wobei von einer bewachsenen LB-Agarplatte eine satellitenfreie Einzelkolonie gepickt wurde. Zur Herstellung einer Vorkultur

wurde Ampicillin-haltiges LB-Medium (25ml) mit dieser Einzelkolonie in einem 50ml Falcon Plastikröhrchen angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 200UpM inkubiert. Die inkubierte Vorkultur wurde in 1l Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und weiter im Schüttelinkubator bei gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde in 1cm breiten Kunststoffküvetten die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) im UV-Spektralphotometer gemessen. Bei einer Extinktion von 0,8 wurde das Bakterienwachstum durch Zugabe von 5ml Chloramphenicol abgestoppt. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C und 200UpM über Nacht. Chloramphenicol hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese und damit die weitere Zellteilung, während die Plasmid-DNA-Replikation unbeeinflusst bleibt, wodurch diese angereichert wird. Am Folgetag wurde die Kultur auf vier Zentrifugenbecher verteilt und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Beckman Centrifuge J2-21 mit Beckman JA-14 Rotor) 15min bei 4000UpM zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets (4 pro Konstrukt) in jeweils 11,25ml eiskalter, hyperosmolarer STE-Lösung resuspendiert und jeweils zwei Bakterienextrakte in einem 50ml Zentrifugenröhrchen vereinigt (2 pro Konstrukt). Zu jeweils 22,5ml Bakteriensuspension wurden 1,5ml Lysozym-Lösung hinzugegeben und gut gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden 1,8ml EDTA (0,5M; pH 8,0) dazugegeben, und nach weiteren 5min auf Eis folgte die Zugabe von 14,4ml Triton-Mix. Zum Lysieren der Bakterien wurden die Zentrifugenröhrchen während der nächsten 30min unter einem alle 5min erfolgenden kräftigen Schwenken wieder auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine einstündige Zentrifugation bei 16.000UpM und 4°C (Beckman JA-20 Rotor). Die DNA-haltigen und von Zelltrümmern befreiten Überstände zusammengehöriger Ansätze wurden in einem 250-ml-Zentrifugengefäß unter Zugabe von 40ml 30%iger PEG-Lösung vereinigt und für etwa eine Stunde, bis es zu einem Ausfallen von nukleinsäurehaltigen Präzipitaten kam, auf Eis inkubiert. Nach einer zehn-minütigen Zentrifugation bei 10.000UpM und 4°C (Beckman JA-14 Rotor) wurde der Überstand durch Absaugen und Trocknung so vollständig wie möglich entfernt, bevor das DNA-haltige Pellet in 10ml TNE-Puffer resuspendiert wurde. Dieser Suspension wurden 10,9g Cäsiumchlorid (CsCl) und 150µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) zugesetzt und anschließend wurde diese Lösung in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen überführt, welches auf 0,05g austariert und versiegelt wurde. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 20 Stunden bei 60.000UpM und 20°C (Beckman Ultrazentrifuge L5-65, 70,1-Ti-Rotor) zum Ausbilden eines CsCl-Dichtegradienten, durch den die Ethidiumbromid-gefärbte zirkuläre Plasmid-DNA als distinkte Bande dargestellt wurde. Diese Bande wurde mit einer 5ml Spritze und einer 20-G-

Kanüle abgezogen und in ein 15ml Falcon Plastikröhrchen gegeben. Um das interkalierende Ethidiumbromid aus der viskösen DNA-Lösung zu entfernen, wurde fünfmal (bis beide Phasen komplett farblos waren) ein äquivalentes Volumen an dem organischen Lösungsmittel Isoamylalkohol hinzugefügt, auf einem Vortexer gemischt, bei 3000UpM und RT für 30sec zentrifugiert und die obere Phase verworfen. Zur Entfernung des CsCl wurde die DNA-haltige untere Phase dann in einen Dialyseschlauch überführt und bei 4°C zweimal 12h lang gegen 11 TE-Puffer pro Probe dialysiert. Anschließend wurde die so gewonnene Plasmid-DNA-Lösung aus dem Dialyseschlauch in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration und die Reinheit spektralphotometrisch bei 260 und 280nm (s. 2.13.4) ermittelt. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau (s. 2.13.5) und Agarosegelelektrophorese (s. 2.13.6) auf seine Korrektheit überprüft.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
STE-Lösung	25% (w/v) Saccharose 50mM Tris/HCl (pH 8,0) 1mM EDTA (pH 8,0) <i>gelöst in H₂O bidest</i> 50ml pro Konstrukt
Lysozym-Lösung	60mg Lysozym 1ml STE-Lösung 3ml pro Konstrukt
Triton-Mix	0,1% (v/v) Triton X-100 50mM Tris/HCl (pH 8,0) 60mM EDTA (pH 8,0) <i>gelöst in H₂O bidest</i> 30ml pro Konstrukt
PEG-Lösung	30% (w/v) PEG 6000 1,5M NaCl <i>gelöst in H₂O bidest</i> 40ml pro Konstrukt
TNE-Puffer	10mM Tris/HCl (pH 8,0) 10mM NaCl 1mM EDTA (pH 8,0) <i>gelöst in H₂O bidest</i>

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
TE-Puffer	10ml pro Konstrukt 10mM Tris/HCl (pH 8,0) 1mM EDTA (pH 8,0) <i>gelöst in H₂O bidest</i> 2x1 l pro Konstrukt

2.13.4 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch in 1-cm-Quarzküvetten durch Bestimmung der Extinktion bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Aus empirisch ermittelten Daten ist bekannt, dass ein Extinktionswert von 1,0 einer Konzentration von 50µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter Lösung entspricht (Sambrook et al. 1989). Nach dem Lambert-Beer-Gesetz lässt sich die Konzentration demnach folgendermaßen berechnen $C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Um die Reinheit der aufgereinigten DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen und das Verhältnis $OD_{260/280}$ bestimmt. Proteinfreie, reine DNA sollte einen $OD_{260/280}$ -Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

2.13.5 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Enzyme erkennen spezifische Nukleotidsequenzen innerhalb der DNA. Bei der Inkubation mit den Restriktionsenzymen, welche an zwei oder mehreren Stellen schneiden, entstehen Fragmente mit definierter Länge. Durch die Spaltung der DNA wird das Plasmid linearisiert, und die Gesamtgröße kann in der darauf folgenden horizontalen Agarosegelelektrophorese (s. 2.13.6) bestimmt werden. Da die Effizienz der Restriktionsenzyme von der Reinheit der DNA abhängig ist, kann über diese Methode auch die Qualität der DNA überprüft werden (Sambrook et al. 1989). In einem Restriktionsverdau wurde 1µg DNA zu 5 Einheiten eines oder zweier Restriktionsenzyme (in den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen und sterilisiertem H₂O) gegeben. Der Gesamtansatz betrug 10µl und inkubierte bei 37°C für 1h. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch Zugabe von 2µl Stopp-Mix (sechsfach konzentriert) inaktiviert. Die Produkte wurden zur Analyse der Fragmentlänge in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

Lösung	Zusammensetzung
6x Stopp-Mix	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF <i>gelöst in H₂O bidest</i>

2.13.6 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle nach ihrer Fragmentgröße (0,1 bis 25kb Länge) auftrennen, da die negativ geladenen Nukleotide im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Anzahl der Basenpaare und der Sekundärstruktur. Nach der erwarteten Fragmentlänge wurde im 1x TAE-Puffer eine Agarosekonzentration von 1,0% (w/v) gewählt. Zur Herstellung des Agarosegels wurden diese Bestandteile in einer Mikrowelle kurz aufgekocht, bis sie vollständig gelöst waren. Nach kurzem Abkühlen wurde das noch flüssige Gemisch mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5µg/ml). Mit Hilfe dieser interkalierenden Substanz, die an die DNA bindet und durch kurzwelliges UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird, kann die DNA später sichtbar gemacht werden. Die noch heiße Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen, und es wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen für die Proben zu erzeugen. Nach Abkühlung und Polymerisation des Agarosegels wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Horizontalelektrophoresekammer gelegt. Die mit Stopp-Mix (sechsfach konzentriert) versetzten Restriktionsverdau-Ansätze (12µl; s. 2.13.5) sowie ein DNA-Größenmarker (5µl) wurden in die einzelnen Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90V (ca. 0,5V/cm²), bis die farbige Lauffront das letzte Drittel des Gels erreicht hatte. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254nm detektiert und durch eine Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter dokumentiert werden.

Elektrophoresepuffer	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2M Tris/HCl (pH 8,0) 1M Essigsäure 50mM EDTA (pH 8,0) <i>gelöst in H₂O</i>

2.14 Transiente Transfektion

2.14.1 Transfektion von siRNA

Die siRNA23 (Sequenz s. 2.8) wurde in transienten Transfektionen eingesetzt, um die Expression der DLK in den HIT-T15-Zellen durch Interferenz mit der DLK-mRNA zu verringern und damit die Bedeutung dieser Proteinkinase für die Zytokin-induzierten Reaktionswege zu evaluieren. Für das Arbeiten mit siRNA wurden nur dafür vorgesehene Materialien verwendet, und es wurde sehr genau auf mögliche Kontaminationen mit RNAsen geachtet. Während der Schritte wurden die Ansätze nicht gevortext oder zentrifugiert, um ein Anhaften an der Wandung der Eppendorf-Reaktionsgefäße zu vermeiden. Die Transfektion erfolgte 24h nach dem Ausplattieren auf 6-well-plates. Zunächst wurde das Komplettmedium abgesaugt und nach einmaligem Waschen mit RPMI durch 800µl/well Optimem[®] ersetzt. Während des Ansetzens des Transfektions-Agenz wurden die 6-well-plates zurück in den Inkubator gestellt. Für den Ansatz wurden zwei Lösungen zunächst getrennt voneinander hergestellt. In das jeweilige 0,5ml Eppendorf-Cup für die Lösung 1 wurden 345µl Optimem[®] vorgelegt, in die 5µl der DLK-RNAi bzw. der Kontroll-RNAi pipettiert wurden, entsprechend einer Doppelbestimmung (RNAi 50pM/well). Lösung 2 bestand aus dem Transfektionsreagenz Oligofectamine[™], das in einem Verhältnis von 1:125 zum Transfektionsvolumen (8µl auf 1ml) stand und zum vorgelegten Optimem[®] zu 50µl pro Doppelbestimmung hinzugefügt wurde. Beide Lösungen wurden nach dem Ansetzen 5min inkubiert, woraufhin dann Lösung 2 zu Lösung 1 gegeben wurde. Dieser Ansatz inkubierte für weitere 15min bei Raumtemperatur, bevor auf die jeweiligen wells 200µl des Gesamtansatzes verteilt wurden. Die so vorbereiteten wells kamen 4h in den Inkubator, während die Transfektion ablief. Nach dieser Phase wurde Komplettmedium (s. 2.15.2; dreifach konzentriert) hinzugegeben und die Zellen wurden für weitere 48h inkubiert. Nach dieser Inkubation fand die Behandlung der Zellen mit den Reagenzien statt. Die Zellen wurden mit 90µl Lysispuffer geerntet. Von dem Zell-Lysat wurden 200µg Protein zum immunologischen Nachweis eingesetzt.

Tabelle 2.1: Pipettierschema der Transfektion von siRNA

Lösung 1	Lösung 2
5µl RNAi (50pM/well)	16µl Oligofectamine [™]
Optimem [®] ad 350µl pro Doppelbestimmung	Optimem [®] ad 50µl pro Doppelbestimmung

2.14.2 Transfektion von Plasmid-DNA nach der METAFECTENE™-Methode

Mit Hilfe dieser Transfektionsmethode wird DNA in eukaryotische Zellen eingebracht, wodurch es zur Expression des gewünschten Gens kommt. Zellauszählungen haben ergeben, dass die Effizienz der METAFECTENE™-Methode in den HIT-T15-Zellen bei 14,13% liegt (Plaumann 2007). Diese polykationische Transfektionsreagenz komplexiert die zu transfizierende DNA in kompakte Strukturen (DNA-Lipidkomplexe), so dass der Eintritt in die Zelle per Endozytose stattfinden kann, in der die DNA daraufhin wieder komplett freigelegt wird (vgl. Biontix-Produktinformation). Die Vorbereitung der Transfektion fand direkt nach dem Ausplattieren der Zellen statt (s. 2.15.6), so dass die Transfektion innerhalb der ersten Stunde nach dem Splitten gestartet werden konnte. Innerhalb dieser Zeit wurden die HIT-T15-Zellen in den Inkubator gestellt. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen zunächst getrennt hergestellt. In ein 15ml-Bluecap für die Lösung 1 wurde zunächst entsprechend der jeweils zu transfizierenden DNA-Konzentration (3,5µg/Versuchsansatz) Optimem® zu 1800µl vorgelegt. Ein 15ml-Bluecap umfasste dabei drei Doppelbestimmungen mit der jeweils zu transfizierenden DLK-cDNA (Gesamtvolumen: 300µl/Ansatz). In ein weiteres 15-ml Bluecap für Lösung 2 wurden 2µl Metafectene™/1µg DNA (7µl/Versuchsansatz) zum vorgelegten Optimem® zu 300µl pro Ansatz hinzugefügt. Dies entsprach einem Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA von 2:1. Diese Lösungen wurden vorsichtig geschwenkt und anschließend in dem 15-ml Bluecap mit der jeweiligen DNA vereinigt. Dieser Ansatz wurde wiederum vorsichtig geschwenkt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden auf eine 6-cm-Kulturschale 600µl dieser METAFECTENE™-DNA-Transfektionslösung pipettiert und die Zellen für 48h inkubiert. Während dieser Zeit waren die Zellen der Transfektionslösung ausgesetzt und konnten gegebenenfalls mit Reagenzien zu den entsprechenden Zeitpunkten behandelt werden.

Tabelle 2.2: Pipettierschema der METAFECTENE™-Methode

Lösung 1	Lösung 2
3,5µg DNA	7µl METAFECTENE™
Optimem® ad 300µl pro Ansatz	Optimem® ad 300µl pro Ansatz

2.15 Standardtechniken für das Arbeiten mit Zellkulturen

2.15.1 Zelllinie HIT-T15

Die permanente Zelllinie HIT-T15 ist aus pankreatischen Betazellen des syrischen Hamsters, die mit dem Simian-Virus-40 (SV-40) transformiert wurden, entwickelt worden (Santerre et al. 1981). Um die Variation der physiologischen Eigenschaften mit zunehmender Passagierung zu vermindern und Ergebnisse auch über längere Perioden vergleichen zu können, wurden im Laufe der Versuche neue Zellklone gleicher Passagezahl aus dem Reservoir der tiefgefrorenen Zellen, die bei -196°C in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank aufbewahrt wurden, entnommen.

2.15.2 Medien und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
PBS	140mM NaCl 2,5mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄ <i>gelöst in H₂O bidest, mit NaOH auf pH 7,4 titriert, autoklaviert</i>
RPMI 1640-Medium	10g RPMI 1640-Pulver 2g NaHCO ₃ <i>H₂O bidest ad 1000ml sterilfiltriert</i>
Komplettmedium	10% (v/v) Fötale Kälberserum 5% (v/v) Pferdeserum 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin in RPMI 1640-Medium

2.15.3 Standardbedingungen der Zellkultivierung

Alle Schritte der Zellkultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das Arbeiten fand unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Luftstrom statt. Vor dem Arbeiten wurde eine

hygienische Händedesinfektion durchgeführt. Alle unter der Sterilbank verwendeten Gegenstände wurden vorher mit 70%igem Isopropanol abgewischt. Verwendete Lösungen und Medien waren sterilfiltriert oder autoklaviert und wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Mit den HIT-T15-Zellen kontaminierte Materialien und Lösungen wurden gesondert entsorgt. Die Zentrifugation zwischen den Arbeitsschritten erfolgte stets für 2min bei Raumtemperatur und mit einer Drehzahl von 1300UpM, um die Zellen nicht zu schädigen. Die Kultivierung der HIT-T15-Zellen im Inkubator erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und unter 5% CO₂-Begasung. Für die Passagierung der Zellen wurden 15-cm-Zellkultur-Schalen verwendet, auf denen die HIT-T15-Zellen größtenteils als Monolayer adhärent wuchsen. Zur Prüfung der Vitalität der Zellen wurde das Wachstum und der Phänotyp regelmäßig unter einem Mikroskop beurteilt. Nach Manipulation der Zellen durch Splitten oder nach einem Mediumwechsel mussten die Zellen für 48h ohne weitere Manipulation im Inkubator verbleiben. In dieser Zeit konnten jedoch Reagenzien zu den gewünschten Zeitpunkten in das Medium gegeben werden (s. 2.15.7).

Kulturplatte	Gesamtmenge Kulturmedium	Zellzahl (bei Monolayer)	Verwendungszweck
15-cm-Schale	15ml	ca. 3-5x10 ⁷	Kultivierung und Passagierung (s. 2.15.4)
6-cm-Schale	5ml	ca. 3-5x10 ⁶	Transfektion von DNA (s. 2.14.2), IP-Kinase Assay (s. 2.16.4/2.17), Western Blots (s. 2.16.3)
2-cm-well (6-well-plate)	2ml	ca. 3-5x10 ⁶	Transfektion von siRNA (s. 2.14.1)

2.15.4 Splitten der HIT-T15-Zellen (Zellpassagierung)

Zur Passagierung der HIT-T15-Zellen wurden 15-cm-Zellschalen verwendet. Nach einem Zeitraum von sieben Tagen waren die 15-cm-Zellschalen konfluent bewachsen und die HIT-T15-Zellen wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit 10-12ml PBS pro Schale von weiteren Mediumresten durch vorsichtiges Schwenken befreit. Das PBS wurde abgesaugt, und um die adhärennten Zellen von der Schale zu lösen, wurden 3-4ml Trypsin durch leichtes Schwenken auf der

Platte verteilt und die Schale für 4-5min im Inkubator inkubiert. Leichtes Klopfen an den Seiten erleichterte das Lösen der Zellen von der Platte. Daraufhin wurde das Trypsin durch 10-12ml Komplettmedium inaktiviert. Mit einer Glaspipette wurden die restlichen adhärenen Zellen durch Abspülen gelöst, und die gesamte Suspension wurde in ein 50ml Bluecap überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 2min bei 1300UpM. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen wurden mit 10ml Komplettmedium resuspendiert, um das restliche Trypsin zu entfernen. Die Zellen wurden erneut im Bluecap zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Mit 10ml Komplettmedium erfolgte die Resuspension der Zellen, woraufhin weitere 10ml hinzugefügt wurden. Um auf das Endvolumen von 30ml auf der Kulturschale zu kommen, wurden 25ml Komplettmedium pro Schale vorgelegt und 5ml pro Schale von der Zellsuspension hinzugefügt. Die Schalen wurden konzentrisch geschwenkt und in den Inkubator gestellt.

2.15.5 Mediumwechsel

Die Erneuerung des Kulturmediums erfolgte 3-4 Tage nach dem Splitten in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten. Dafür wurde das verbrauchte Komplettmedium abgesaugt und 30ml neues Komplettmedium vorsichtig an den Rand der Schale pipettiert.

2.15.6 Ausplattieren der HIT-T15-Zellen für die Versuchsreihen

Das Ausplattieren der Zellen erfolgte im Wesentlichen wie das Splitten (s. 2.15.4). Nach dem Waschvorgang zum Entfernen der Trypsin-Reste und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen mit 10ml Komplettmedium resuspendiert und mit weiterem Komplettmedium auf das gewünschte Endvolumen gebracht, um die Zellen für die Versuche auszuplattieren. Dieses Endvolumen richtete sich nach dem Verhältnis von Zellzahl zur Größe der genutzten Zellschälchen, ausgehend von einer konfluierend mit Zellmonolayern bewachsenen 15-cm-Schale mit etwa $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen. Es wurde jeweils pro Schälchen ein Volumen an Komplettmedium vorgelegt, angepasst an das zu erreichende Endvolumen der jeweiligen Größe des Schälchens (s. 2.15.3), und daraufhin das entsprechende Volumen der Zellsuspension hinzugefügt. Die ausplattierten Zellen kamen bis zur Transfektion bzw. Weiterbehandlung in den Inkubator. Während der Inkubationszeiten und nach Behandlung der Zellen mit Reagenzien wurden die Zelldichte und der Phänotyp der HIT-T15-Zellen stichprobenartig unter dem Mikroskop untersucht.

2.15.7 Behandlung der Zellen mit Reagenzien

Stammlösung	Zusammensetzung
TNF α (100ng/ μ l)	20 μ g TNF α 200 μ l H $_2$ O (Aqua ad ini.) <i>aliquotiert aufbewahrt bei -20°C</i> kurz vor Versuch 1:3 mit H $_2$ O verdünnt auf 30ng/ μ l
IL-1 β (100ng/ μ l)	10 μ g IL-1 β 100 μ l H $_2$ O (Aqua ad ini.) <i>aliquotiert aufbewahrt bei -20°C</i> kurz vor Versuch 1:10 mit H $_2$ O verdünnt auf 10ng/ μ l
Ciclosporin A (830 μ M)	1mg Ciclosporin A 0,1ml Ethanol abs. 20 μ l Tween 80 Inkomplettes Medium (ohne Serum) tropfenweise ad 1ml <i>sterilfiltriert,</i> <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei 4°C</i>
SP600125 (68mM)	5mg SP600125 334 μ l DMSO <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei -20°C</i> für Versuche 25mM Aliquot: 1:2,725 verdünnt mit DMSO
Anisomycin (0,5mg/ml)	0,5mg Anisomycin 1ml DMSO <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei 4°C</i>
Cycloheximid (50mg/ml)	50mg Cycloheximid 1ml DMSO <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei 4°C</i>
Lactacystin (10mM)	2mg 531,3 μ l DMSO <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei -20°C</i>

Stammlösung	Zusammensetzung
Epoxomicin (1mM)	50µg Epoxomicin 90,14µl DMSO <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei -20°C</i> für Versuche 0,5mM Aliquot: 1:2 verdünnt mit DMSO

Die ausplattierten HIT-T15-Zellen wurden zu den gewünschten Zeitpunkten vor Ernte mit bestimmten Reagenzien behandelt. Falls DMSO als Lösungsmittel diente, erhielten alle Zellen, die nicht das in DMSO gelöste Reagenz erhielten, das entsprechende Volumen an reinem DMSO zu denselben Zeitpunkten, um einen eventuellen Effekt durch dieses Lösungsmittel auszuschließen.

Ciclosporin A wurde als Positivkontrolle in den Versuchsreihen für das IP-Kinase-Assay eingesetzt und 10min vor der Lyse auf die Zellen pipettiert (Plaumann et al. 2008).

SP600125, ein Zell-permeabler, selektiver und reversibler Anthrapyrozolon-Inhibitor der c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Bennett et al. 2001), wurde 90 Minuten vor Lyse, und somit 30 Minuten vor Behandlung der Zellen mit TNF α , auf die Zellen pipettiert.

Cycloheximid (CHX) wurde zur Ermittlung der Halbwertszeit der DLK zum Zeitpunkt 24h, 12h, 6h, 2h, 30min vor Lyse auf die Zellen pipettiert. Weiterhin wurde es im Versuch 7h vor Lyse und somit 1h vor Zytokin-Behandlung zur Proteinsynthesehemmung angewandt. CHX wirkt als Translationshemmstoff auf die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen von Eukaryonten (80S), sowie den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf entstehende Peptide (Obrig und Gottlieb 1970).

Anisomycin, ein Proteinsynthese-Inhibitor, der in niedriger Konzentration zu einer starken Phosphorylierung von JNK führt ohne dabei die Proteinsynthese zu inhibieren (Cano et al. 1994), wurde in den Versuchen zur Untersuchung der Zytokin-induzierten JNK-Phosphorylierung als Positivkontrolle eingesetzt und 1 Stunde vor Lyse auf die Zellen pipettiert.

Lactacystin, ein Zell-permeabler und irreversibler Hemmstoff des 20S Proteasoms, welches

ein essentieller Bestandteil der Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Degradation intrazellulärer Proteine ist (Dick et al. 1996), wurde 15h vor Lyse und somit 3h vor der Behandlung der Zellen mit Zytokinen, auf die Zellen pipettiert. Die Akkumulation von MafA bei Proteasom-Inhibition durch Lactacystin (10 μ M) in HIT-T15-Zellen (Harmon et al. 2005), konnte zur Überprüfung der Wirkung des Inhibitors immunologisch nachgewiesen werden (Blot nicht abgebildet).

Epoxomicin, ein Zell-permeabler, selektiver und irreversibler Hemmstoff des Proteasoms (Meng et al. 1999), wurde 15h vor Lyse und somit 3h vor der Behandlung der Zellen mit Zytokinen auf die Zellen pipettiert. Bei Einsatz von Epoxomicin konnte eine Akkumulation von MafA in den HIT-T15-Zellen immunologisch nachgewiesen werden (s. Lactacystin; Blot nicht abgebildet).

Tabelle 2.3: Pipettierschema der Reagenzien

Stammlösung	Menge pro 6-cm-Schale	Endkonzentration	Behandlung der Kontrolle
TNF α (30ng/ μ l)	5 μ l	30ng/ml	---
IL-1 β (10ng/ μ l)	5 μ l	10ng/ml	---
Ciclosporin A (830 μ M)	30 μ l	5 μ M	---
SP600125 (25mM)	5 μ l	25 μ M	5 μ l DMSO
Anisomycin (0,5mg/ml)	150 μ l auf 1,5ml	50 μ g/ml	---
Cycloheximid (50mg/ml)	5 μ l	50 μ g/ml	5 μ l DMSO
Lactacystin (10mM)	5 μ l	10 μ M	5 μ l DMSO
Epoxomicin (0,5mM)	5 μ l	500nM	5 μ l DMSO

2.16 Methoden zur Proteincharakterisierung

2.16.1 Zellyse und Herstellung von Zellextrakten

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	50mM Hepes pH 7,5 150mM NaCl 1,5mM MgCl ₂ 1mM EGTA pH 8,0 10% Glycerin 1% Triton X-100 0,5% NP-40 <i>Phosphataseinhibitoren:</i> 1mM Na-ortho-vanadat 50mM NaF 20mM β-Glycerophosphat 150nM Okadasäure (<i>kurz vor Gebrauch</i>) <i>zusätzlich kurz vor Gebrauch PPI</i>
Proteaseinhibitoren (PPI)	
PMSF	Stammlösung 200mM in Ethanol abs. Puffer 1:100
Leupeptin	Stammlösung 2μM in H ₂ O Puffer 1:2000
Aprotinin	Stammlösung 5μM in DMSO Puffer 1:1000
Pepstatin	Stammlösung 1μM in H ₂ O Puffer 1:1000 <i>in Aliquots gelagert bei -20°C</i>
Stopppuffer (4x)	250mM Tris/HCl pH 6,8 8% SDS (w/v) 40% Glycerin (v/v) 20% β-Mercaptoethanol (v/v) 0,03% Brom-Phenolblau (w/v) <i>gelagert bei -20°C</i>

Nach Behandlung der ausplattierten Zellen mit den jeweiligen Reagenzien (s. 2.15.7) wurden die Zellen geerntet. Die dafür notwendigen Schritte erforderten keine sterilen Bedingungen mehr. Das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden mit vorsichtig an den Rand pipettierten 4ml PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellschälchen auf Eis gelagert, um jeglichen Abbau bzw. die Phosphorylierung von Proteinen zu vermeiden. Für das Zufügen des Lysispuffers wurde, um die Volumina möglichst unbeeinflusst von der Verseifung konstant zu halten, für jede Schale eine neue Spitze verwendet. Auf eine 6cm-Schale wurden 250µl Lysispuffer, auf die 6-well-plates 90µl pro well pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die adhärenen Zellen vom Boden der Schalen abgekratzt und mit einer Pipette in Eiswasser gelagerte Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. Der Zellschaber wurde nach jedem Schälchen in einem Becherglas mit H₂O bidest abgespült und trockengetupft. Um die Lyse der Zellen zu beschleunigen, wurden sie mit je einer 1ml Spritze mit G-20 Kanüle pro Eppendorf-Reaktionsgefäß geschert. Dabei wurde der Inhalt der Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgesaugt und forciert zurückgespritzt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, mit einer kurzen Pause nach dem dritten Mal, bei der die Spritzen in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen belassen wurden. Nachdem die Eppendorf-Reaktionsgefäße 30min nach Abschluss des Scherens auf Eis gelegen hatten, wurden sie in der Kalt-Zentrifuge (4°C) mit 14000UpM 5min zentrifugiert, so dass am Boden ein Zellpellet entstand. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Lysat wurde entweder durch Vorklärung (s. 2.16.4) für die Immunpräzipitation vorbereitet oder es wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (s. 2.16.2), um es für den immunologischen Nachweis von Proteinen (s. 2.16.3) einsetzen zu können.

2.16.2 Photometrische Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad-Protein-Assay nach Bradford (Bradford 1976) gemessen. Für die Bestimmung der Wellenlänge im Photometer mussten, neben zwei Kontroll-Küvetten ohne spätere Proteinzugabe, pro Probe Küvetten mit 799µl H₂O vorbereitet werden. Zu diesem Volumen wurde 1µl der jeweiligen Proteinlösung pipettiert. Direkt vor der Messung wurden dann 200µl filtriertes Bio-Rad-Protein-Assay-Agens pro Küvette unter Verwendung neuer Spitzen hinzugefügt. Die Küvetten wurden mit Parafilm dicht verschlossen und geschüttelt. Das Photometer wurde mit den beiden Kontrollküvetten bei einer Wellenlänge von 595nm eingestellt. Daraufhin wurden nacheinander die Küvetten mit den Proteinlösungen im Abgleich mit einer Kontrollküvette gemessen und die jeweilige optische Dichte bestimmt.

Auf gleichem Wege war im Vorfeld die Messung mit einer Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung angefertigt worden, und für die bekannten Konzentrationen ist photometrisch die optische Dichte bestimmt worden. Mit Hilfe dieser standardisierten BSA-Kurve konnte die Proteinkonzentration eines Lysates ermittelt werden. Anhand dieser Konzentration konnte durch Dreisatz ermittelt werden, welches Volumen eines Lysates eingesetzt werden musste, um eine bestimmte Menge an Protein in einem Versuch zu erreichen.

2.16.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid	29,2%:0,8% (w/v) <i>gelöst in H₂O bidest</i> <i>lichtgeschützt aufbewahrt bei 4°C</i>
Trenngelpuffer	1,5M Tris <i>mit HCl auf pH 8,8 titriert</i>
Sammelgelpuffer	0,5M Tris <i>mit HCl auf pH 6,8 titriert</i>
Laufpuffer	25mM Tris/HCl (pH 8,3) 192mM Glycin 0,1% SDS (w/v)
Puffer A (Anodenpuffer 1)	300mM Tris pH 11,3 20% Methanol (v/v)
Puffer B (Anodenpuffer 2)	25mM Tris pH 10,6 20% Methanol (v/v)
Puffer C (Kathodenpuffer)	25mM Tris 20% Methanol <i>mit Borsäure pH auf 9,0 eingestellt</i>
TBS-T 0,1%	10mM Tris/HCl pH 8,0 150mM NaCl 0,1% Tween 20
Blockingpuffer	TBS-T 0,1% Magermilchpulver (fettreduziert), davon 5%ige Lösung für das Blocken 1%ige Lösung als Medium für Antikörper

2.16.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinmischungen und Molekulargewichts-(MG)-Bestimmungen wurden Zellysate durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Gele wurden einen Tag im Voraus gegossen und in Folie eingewickelt im Kühlschrank aufbewahrt. Der Polyacrylamid-Anteil richtete sich dabei nach dem MG des zu untersuchenden Proteins (s. Schema unten). Das Gießen erfolgte zwischen einer Aluminiumplatte und einer Glasplatte, die durch 1,5mm Platzhalter voneinander getrennt und durch Metallklammer zusammengehalten wurden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches anschließend mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet wurde, in das zur Formung der Taschen ein Kamm (10 bzw. 15 Zähne) gesetzt wurde. Für das Auftrennen der Proteine in der Elektrophorese wurden die Taschen dem jeweiligen Versuch entsprechend mit 200µg Protein-enhaltenden Lysat, das zuvor mit Stopppuffer (vierfach konzentriert) versehen und für 10min denaturiert worden war, beladen. Ein MG-Marker wurde parallel mitgeführt. Die eingesetzte Proteinmenge des jeweiligen Lysats wurde zuvor durch photometrische Messung mit Bio-Rad-Assay-Agenz bestimmt und mit Hilfe einer angefertigten BSA-Kurve errechnet (s. 2.16.2). Die Gelelektrophorese, bei der die Proteine ihrer negativen Ladung entsprechend zur Anode wandern, erfolgte unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffers bei 25mA (max. V), bis die farbige Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Bestandteil	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 14%	Sammelgel 4%
Acrylamidlösung	2,67ml	3,33ml	4,67ml	0,67ml
Trenngelpuffer	2,5ml	2,5ml	2,5ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	---	1,25ml
SDS (10%; w/v)	100µl	100µl	100µl	50µl
H ₂ O bidest	4,66ml	4,0ml	2,67ml	2,98ml
Ammoniumpersulfat- lösung (10%; w/v)	100µl	100µl	100µl	50µl
TEMED	12µl	12µl	12µl	5µl

2.16.3.2 Blotten nach der Semi-Dry-Blot-Methode

Die aufgetrennten Proteine des SDS-Gels wurden im weiteren Verlauf elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, auf der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen

gebunden wurden. Dieser Transfer erfolgte mit Hilfe der Semi-Dry-Blot-Methode in einer für diesen Zweck gebauten Transferkammer. In dieser liegt auf in Blotpuffer A bzw. B getränktem Filterpapier die Nitrocellulose-Membran, die vorher für 10min in Blotpuffer B angefeuchtet wurde. Auf die Membran wird das für 20min in Blotpuffer C äquilibrierte Gel geschichtet. Es folgte als nächstes wiederum in Blotpuffer C getränktes Filterpapier. Bei jeder Schicht wurde durch Ausstreichen verhindert, dass Luftblasen verbleiben. An diese Anordnung wurde anschließend Spannung angelegt ($\sim 2\text{mA}/\text{cm}^2$, max. V, $\sim 1\text{h}$).

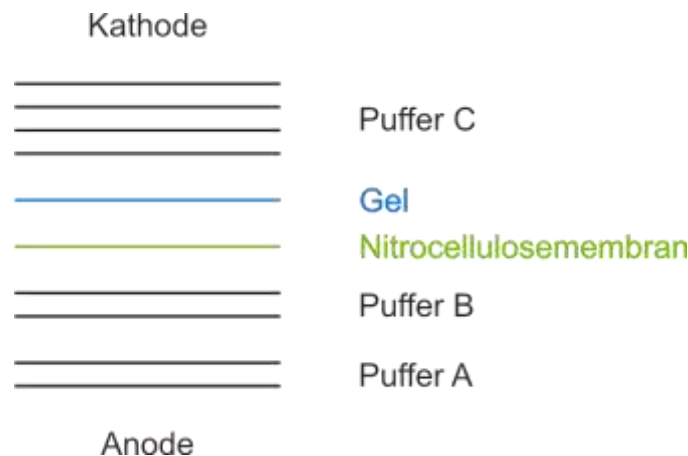


Abb. 2.1: Aufbau der Transferkammer

2.16.3.3 Antigen-Antikörper-Reaktion und Entwicklung von ECL-Filmen

Bevor die Nitrocellulosemembran für den immunologischen Nachweis genutzt werden konnte, mussten die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran zunächst mit einem Blockingpuffer (5% entfettetes Milchpulver in TBS-T) für etwa 2h abgesättigt werden. Auf der geblockten Membran ließen sich mit Hilfe von Antikörpern geblottete Antigene markieren. Dafür wurde die Membran zuerst mit einem ersten Antikörper, der spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war, über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch inkubiert. Am Folgetag wurden bei einem Waschvorgang ($3 \times 10\text{min}$ TBS-T) ungebundene Antikörper weggespült und die Membran wurde mit einem horseradish peroxidase-(HRP)-markierten zweiten Antikörper für 1h inkubiert, wobei es zu dessen Bindung an den ersten Antikörper kam. Nach einem erneuten Waschvorgang fanden die weiteren Schritte in der Dunkelkammer statt. Mit Hilfe der HRP-Markierung des zweiten Antikörpers wurde unter Zugabe einer vom Hersteller mitgelieferten Entwicklerlösung eine ECL-Reaktion gestartet, bei der die Peroxidase die Oxidation von Luminol in alkalischem Milieu katalysiert. Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand versetzt, der durch chemische Substanzen wie

Phenol noch verstärkt wird und eine Chemilumineszenz auslöst (HWZ ~60min; vgl. GE Healthcare-Produktinformation). Nach Exposition eines für diese Lumineszenz sensitiven Röntgenfilms (ECL-Film) wurde dieser anschließend mit Kodak-Entwickler- und Fixierer-Lösung behandelt, gewaschen und getrocknet. Die Expositionszeiten richteten sich nach Art des ersten Antikörpers und gewünschter Schwärzung des ECL-Films. Mit Hilfe des parallel mitgelaufenen Markers konnte das MG der so detektierten Proteine differenziert werden. Zur Auswertung der Banden wurden die ECL-Filme eingescannt und die geblotteten Banden mit der Software Quantity One, Version 4.0 (Bio-Rad), densitometrisch erfasst.

2.16.4 Immunpräzipitation

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer	s. 2.16.1
Kinasepuffer	0,25mM Hepes pH 7,5 100mM NaCl 10mM MgCl ₂ 0,1mM Na-ortho-vanadat <i>gelöst in H₂O bidest</i> <i>kurz vor Gebrauch PPI (Verhältnis s. 2.16.1)</i>
IP-Puffer	50mM Hepes pH 7,5 150mM NaCl 1,5mM MgCl ₂ 1mM EGTA pH 8,0 1% Triton X-100 <i>Phosphataseinhibitoren:</i> 1mM Na-ortho-vanadat 50mM NaF 20mM β-Glycerophosphat 150nM Okadasäure (<i>kurz vor Gebrauch</i>) <i>zusätzlich kurz vor Gebrauch PPI (s. 2.16.1)</i>
Protein A Agarose	50% (w/v) in Lysispuffer Holzman 50% (w/v) in 0,1% BSA/TBS-T Hirai
Sepharose CL4B	50% (w/v) in PBS

2.16.4.1 Immunpräzipitation mit dem DLK-Antikörper von Holzman et al. (1994)

Mit der Immunpräzipitation wurde die endogene DLK aus dem Zell-Lysat isoliert, um durch diese Aufreinigung die katalytische Aktivität der DLK unabhängig von über- und untergeordneten Kinasen und Phosphatasen bestimmen zu können. Gebunden wurde die DLK in Antikörper-Protein-Komplexen an mit Protein A beschichteten Kügelchen, sogenannten Beads, aus dem Polysaccharid Agarose. Das Protein A stammt aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylokokkus aureus* und bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Immunglobuline. Um unspezifische Bindungen an die Protein-A-Agarose zu vermeiden, wurde zunächst eine Vorklärung des Lysates mit der quervernetzten Agarose Sepharose CL4B durchgeführt. Dafür wurden 50µl der 50%igen Sepharose mit einer abgeschnittenen Spitze in das jeweilige Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nachdem die Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 4°C 30min rotiert worden waren, wurden sie bei 4°C mit 14000UpM 5min zentrifugiert, wobei sich die Sepharose-Beads absetzten, so dass der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden konnte. Daraufhin wurde in diesem Lysat die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (s. 2.16.2). Zur Immunpräzipitation wurde eine Proteinmenge von 2000µg eingesetzt. Die Proben wurden jeweils mit Lysispuffer auf 700µl justiert, und es wurden 8µl DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994), sowie 50µl Protein-A-Agarose mit einer angeschnittenen Pipettenspitze pro Probe hinzugefügt. Dieser Ansatz rotierte für etwa 4 Stunden bei 4°C. Die ausgefällten Agarose-Beads wurden anschließend in einem viermal wiederholten Waschvorgang mit 400µl Kinasepuffer vorsichtig schüttelnd von ungebundenen Bestandteilen gesäubert. Zwischen den Waschgängen wurden die Proben in der Kalt-Zentrifuge (4°C) bei 14000UpM für 1min zentrifugiert und der jeweilige Überstand verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bei 70µl belassen, die Proben wurden über Nacht auf Eis gelagert. Von der 70µl Suspension wurde die Hälfte zum immunologischen Protein-Nachweis verwendet, mit SDS-Laemmli-Stopppuffer (vierfach konzentriert) versehen und für 10min bei 95°C denaturiert. Der andere Teil wurde im in-vitro-Kinase-Assay (s. 2.17) zur Bestimmung der Enzymaktivität der DLK eingesetzt.

2.16.4.2 Immunpräzipitation mit dem DLK-Antikörper von Hirai et al. (2006)

Für diese Variante der Immunpräzipitation wurde zunächst in einer ersten Reaktion der Antikörper an Protein-A-Agarose gebunden. Dafür wurde die Protein-A-Agarose in entsprechendem Mengenverhältnis für den Versuch, mit dem anti-DLK-Antikörper (Hirai et

al. 2006) im Verhältnis 5:1 für etwa 5h bei 4°C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Rotation inkubiert. Die so präparierten Beads wurden bei 10000UpM für 20s in der Kalt-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert, zweimal mit 400µl 1% Triton X-100/IP-Puffer mit zwischendurch laufender Zentrifugation (10000UpM, 20s, 4°C) gewaschen und mit dem IP-Puffer auf die bei der Rotation eingesetzte Menge aufgefüllt und resuspendiert. Die Herstellung der Zell-Lysate erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach der Durchführung der oben beschriebenen Vorklärung mit der Sepharose CL4B (s. IP_{Holzman}) wurden die Lysate auf eine Proteinmenge von 2000µg justiert und auf 700µl mit dem IP-Puffer aufgefüllt. Zu den so vorbereiteten Lysaten wurden nun 50µl von der im ersten Reaktionsschritt an Antikörper gebundenen Protein-A-Agarose pro Probe hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde bei 4°C rotierend über Nacht inkubiert. Die sedimentierten Agarose-Beads wurden anschließend in einem viermal wiederholten Waschvorgang mit 400µl Kinasepuffer vorsichtig schüttelnd von ungebundenen Bestandteilen befreit. Zwischen den Waschgängen wurden die Proben in der Kalt-Zentrifuge (4°C) bei 10000UpM für 20s zentrifugiert und der jeweilige Überstand verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand auf 70µl belassen. Von der 70µl Suspension wurde die Hälfte zum immunologischen Protein-Nachweis verwendet, mit SDS-Laemmli-Stopppuffer (vierfach konzentriert) versehen und 10min bei 95°C denaturiert. Der andere Teil wurde im in-vitro-Kinase-Assay (s. 2.17) zur Bestimmung der Enzymaktivität der DLK eingesetzt.

2.17 In-vitro-Kinase-Assay

2.17.1 Standardtechniken für das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen

Der Umgang mit radioaktiven Materialien fand nur in dem dafür ausgewiesenen Isotopenarbeitsbereich statt. Die Arbeitskleidung war mit einer Plakette zur Messung der erhaltenen Strahlung versehen und durfte außerhalb dieses Bereiches nicht getragen werden. Jegliche Arbeitsschritte erfolgten mit Handschuhen und fanden hinter einer ein Zentimeter dicken Plexiglasscheibe statt. Ein Geiger-Müller-Zählrohr detektierte die ausgehende Strahlung während der Tätigkeit und diente zur Feststellung von Kontaminationen des Arbeitsplatzes bzw. der verwendeten Geräte. Kam es zu Kontamination, wurde der jeweilige Gegenstand mit 70%igem Ethanol gereinigt und unter einem Abzug gelagert, bis keine Strahlung mehr detektierbar war. Abfälle wurden in dafür vorgesehene Behälter entsorgt, getrennt nach fest und flüssig.

2.17.2 In-vitro-Kinase-Assay

Stammlösung	Zusammensetzung		
Kinase Assay Ansatz (Mastermix)	Bestandteil	Ansatz pro Probe	Endkonzentration
	[γ - ³² P]ATP	0,3 μ l (3 μ Ci)	1nM
	ATP (1mM)	0,75 μ l	25 μ M
	β -Casein (10 μ g/ μ l)	0,4 μ l	4 μ g/Ansatz
	Kinasepuffer (s.IP)	8,55 μ l (ad10 μ l)	
ATP	200mM für jeden Versuch frisch angesetzt		
β -Casein	1,5mg auf 150 μ l H ₂ O bidest (saurer pH) frisch angesetzt		

Beim in-vitro-Kinase-Assay wurde die enzymatische Aktivität der Proteinkinase DLK (in Abhängigkeit von der Behandlung mit den Cytokinen TNF α und IL-1 β zu unterschiedlichen Zeitpunkten) anhand der Phosphorylierung von dephosphoryliertem β -Casein, eines universellen Substrates, gemessen. Bis auf das [γ -³²P]ATP wurde der Kinase-Assay-Ansatz (Mastermix) im Voraus vorbereitet und zusammen mit den auf 30 μ l aliquotierten immunpräzipitierten Beads fanden die nächsten Arbeitsschritte im Isotopenlabor statt. Das [γ -³²P]ATP (spezifische Aktivität: 3000Ci/mmol) wurde in diesem Bereich dem Ansatz beigelegt, woraufhin 10 μ l von diesem Mastermix pro Probe verteilt wurden. Die Ansätze wurden kurz gevortext und inkubierten anschließend für eine Stunde bei 30°C unter leichtem Schütteln (650UpM) auf dem Thermomixer. Daraufhin wurden die Proben mit SDS-Laemmli-Stoppuffer (vierfach konzentriert) versetzt und für 10min bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert, wobei sich die immunpräzipitierten Komplexe wieder lösen konnten. Es folgte eine kurze Zentrifugation bei 3200UpM für etwa 30s, bei der sich die Beads absetzen konnten. Mit etwa einem Drittel des Gesamtansatzes wurde ein am Vortag gefertigtes 10%iges SDS-Gel (s. 2.16.3.1) beladen und die Proteine wurden in der folgenden Gelelektrophorese aufgetrennt (25mA, max. V). Der verbleibende Probenansatz wurde in einem Plexiglasbehälter strahlensicher eingefroren. Wenn die Lauffront den untersten Bereich des Gels erreicht hatte, wurde das Gel aus der Laufkammer herausgenommen und die Glasplatte sowie die Aluminiumplatte abgehoben. Das Sammelgel und die unterste Front wurden entfernt und das restliche Trenngel auf ein Whatman-Papier gelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und auf dem Drygel Sr. Gelrockner 1160 bei 70°C für etwa 90min zum Trocknen gelegt. Zur Auswertung wurde das getrocknete Gel in eine Kassette gelegt, in der ein PhosphorImager-Screen für gewählte Zeitpunkte exponiert werden konnte. Dieser

Screen konnte dann in den PhosphorImager eingelesen und mit Hilfe der Software Aida, Version 4.15 (Raytest), ausgewertet werden.

2.18 Auswertung und Statistik

Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes ($SEM = SD/\sqrt{n}$) der Messergebnisse identisch behandelter Proben dar. Zur quantitativen Auswertung von ECL-Filmen diente die Quantity One Software, Version 4 (Bio-Rad). Die PhosphoImager Screens wurden mit Hilfe der Software Aida, Version 4.15 (Raytest), ausgewertet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mit Hilfe des gepaarten Student's-t-Test mit der Software Excel 2003 (Microsoft[®]) ermittelt. Zur Gegenüberstellung von mehr als zwei Gruppen wurde eine one-way ANOVA Analyse mit Hilfe von STATISTICA[®], Version 7.0 (StatSoft 2004), angewandt. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von SigmaPlot, Version 9.0 (Systat Software 2004), und mit CorelDRAW[®] X3, Version 13.0 (Corel 2005), erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF α auf die DLK

Die erhöhte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF α im Fettgewebe und der damit verbundene erhöhte TNF α -Spiegel im Blut führen zu einer zunehmenden Insulinresistenz im peripheren Gewebe, wie in mehreren Studien an Modellen und adipösen Probanden nachgewiesen werden konnte (Uysal et al. 1997; Hirosumi et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von TNF α auf die Regulation der DLK, die bei Überexpression zu gesteigerter Apoptose führt (Plaumann et al. 2008), in der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 untersucht. Um die Wirkung von TNF α auf die enzymatische Aktivität der DLK zu untersuchen, wurden Kinase-Assays mit immunpräzipitierter zellulärer DLK durchgeführt. Weitere Versuche dienten der Untersuchung der Auswirkung einer Verminderung der zellulären DLK auf die Phosphorylierung der der DLK untergeordneten JNK sowie auf die Apoptose der Zellen.

3.1.1 Die Wirkung von TNF α auf die enzymatische Aktivität der DLK in einer pankreatischen Betazelllinie

3.1.1.1 Effizienz der Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK

Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu überprüfen, wurden 50% der mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) immunpräzipitierten DLK jeweils nach Zugabe von SDS-Laemmli-Stopppuffer durch Erhitzen von den Protein-A-Agarose-Beads gelöst und 50% des Überstandes, sowie jeweils 200 μ g des nicht immunpräzipitierten Lysats in einer SDS-PAGE eingesetzt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und im immunologischen Nachweis mit dem obengenannten DLK-Antikörper dargestellt.

Abb. 3.1 zeigt, dass die DLK aus dem Lysat mit dem DLK-Antikörper immunpräzipitiert werden konnte. Der Immunoblot stellt die DLK-Anteile dar, die nach der Immunpräzipitation

vorhanden waren. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht.

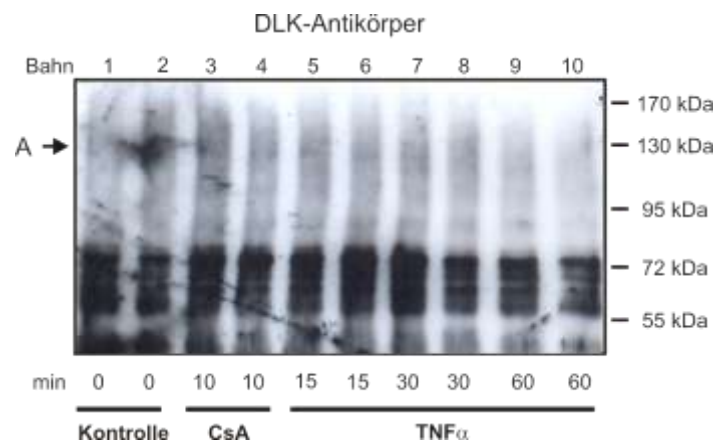


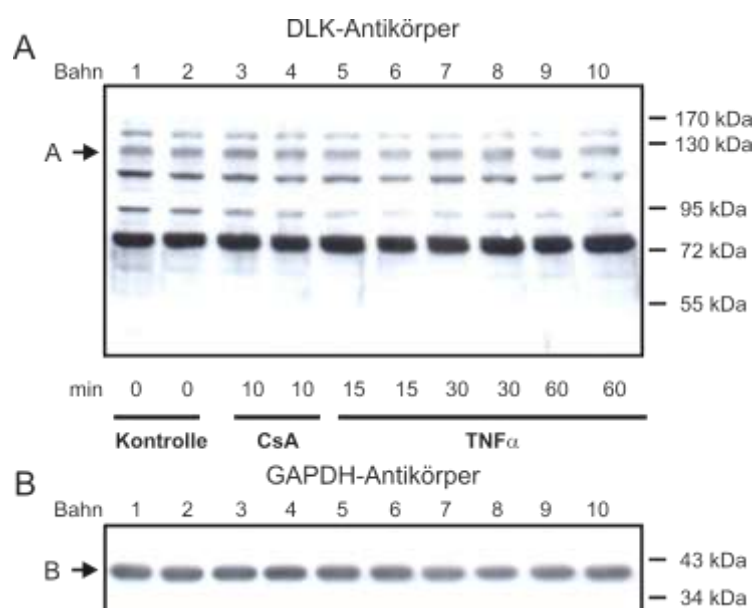
Abb. 3.1: Zelluläre DLK kann mit dem DLK-Antikörper von Holzman et al. (1994) aus dem Betazell-Lysat immunpräzipitiert werden. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten zur Proteincharakterisierung erfolgte die Immunpräzipitation der zellulären DLK mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994). Hier dargestellt ist ein Western Blot eines Lysats nach Immunpräzipitation. Der immunologische Nachweis wurde ebenfalls mit dem DLK-Antikörper durchgeführt. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht.

3.1.1.2 Kinase-Assay mit immunpräzipitierter DLK

Um die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf die enzymatische Aktivität der DLK zu untersuchen, wurden Kinase-Assays mit immunpräzipitierter zellulärer DLK durchgeführt. HIT-T15-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume (15min, 30min, 60min vor Ernte) mit 30ng/ml $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, sowie 10 Minuten vor der Ernte mit 5 μM Ciclosporin A behandelte Zellen. Die Verwendung von Ciclosporin A diente als Positivkontrolle, da es zu einer Zunahme der enzymatischen Aktivität der DLK führt (Plaumann et al. 2008). Nach Zellyse und Herstellung von Zellextrakten für die Proteincharakterisierung erfolgte die Immunpräzipitation, in der 2000 μg des Zell-Lysates mit einem gegen die 223 C-terminalen AS der DLK gerichteten Antikörper (Holzman et al. 1994) eingesetzt wurden, durch den die DLK an Protein-A-Agarose-Beads gekoppelt wurde. 30-50% der immunpräzipitierten Beads wurden im Kinase-Assay mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ verwandt, um eine messbare Phosphorylierung des ebenfalls zugefügten universellen Substrates $\beta\text{-Casein}$ zu gewährleisten. Nach Ablauf der Reaktion wurden 50% des Überstandes dieser Proben denaturiert und mit einem Molekulargewichtsmarker auf einem 10%igen Polyacrylamidgel

elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Einbau des radioaktiv markierten Phosphats in das Casein anhand der γ -Strahlung durch einen Phospho-Imager detektiert.

Die Abb. 3.2 A zeigt das Lysat vor Immunpräzipitation und dient als Kontrolle für das gleichmäßige Beladen des Polyacrylamidgels sowie das gleichmäßige Einsetzen der Proteine in der Immunpräzipitation und damit in dem in-vitro-Kinase-Assay. Der immunologische Nachweis wurde mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) durchgeführt. Die durch Pfeil A markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Es erfolgte ebenfalls ein Abgleich der Proteinmenge durch einen GAPDH-Antikörper wie in Abb. 3.2 B mit dem Pfeil B dargestellt. Die Abb. 3.2 C zeigt eine Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeils C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb. 3.2 D ist die quantitative Auswertung der die Casein-Phosphorylierung repräsentierenden Bande dargestellt; zusammengestellt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in Doppelbestimmung. Den Ausgangswert bildeten die unbehandelten Zellen mit $100 \pm 5\%$, auf den sich die folgenden Werte beziehen. Eine 10-minütige Behandlung mit $5\mu\text{M}$ CsA führte zu einer signifikanten DLK-Aktivitäts-Zunahme auf $151 \pm 14\%$. Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ resultierte nach 15min Inkubationszeit in einer Aktivitätssteigerung auf $125 \pm 10\%$, nach 30min lag diese bei $129 \pm 14\%$ und stieg nach 60min signifikant auf $147 \pm 10\%$ an.



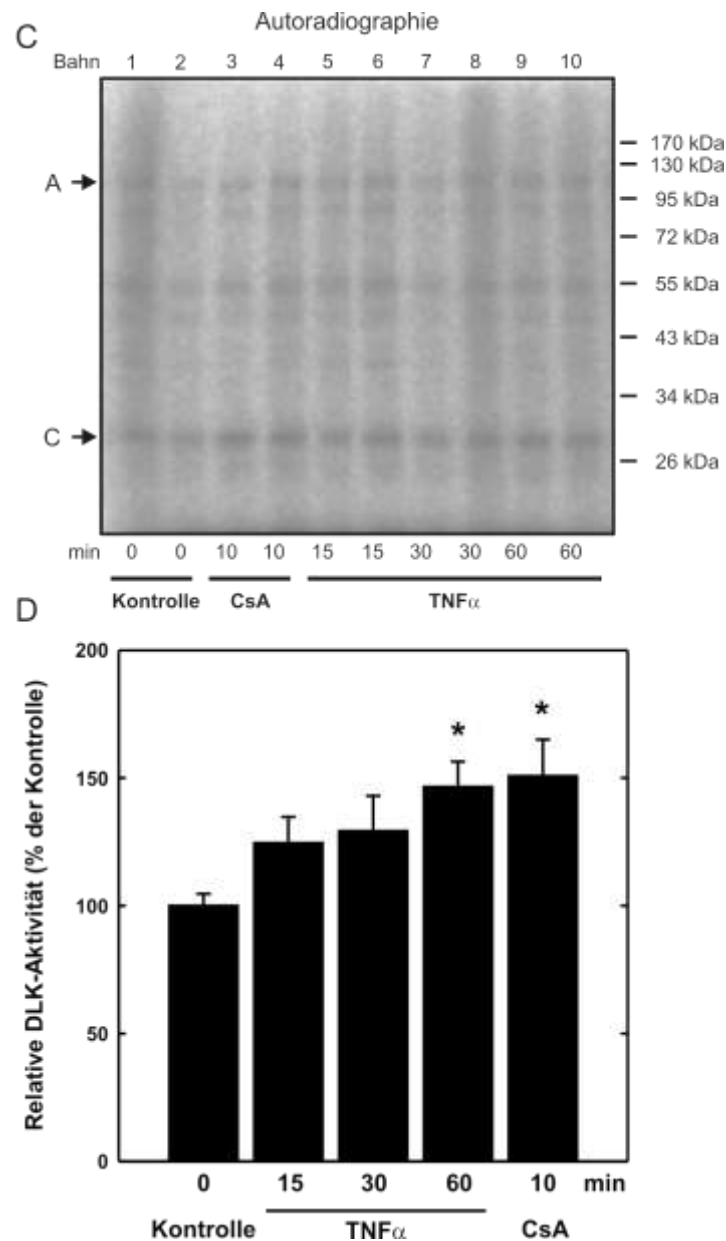


Abb. 3.2 Die enzymatische Aktivität der DLK wird durch Behandlung mit TNF α gesteigert. Nach der Behandlung mit 30ng/ml TNF α zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die enzymatische Aktivität der immunpräzipitierten DLK in einem in-vitro-Kinase-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 5 μ M Ciclosporin A eingesetzt. Dargestellt sind in 3.2 A und B Western Blots, die zum Nachweis eines gleichmäßigen Einsetzens der Proteinmenge für die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) und GAPDH durchgeführt wurden. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Die bei 36kDa migrierende GAPDH ist mit dem Pfeil B markiert. Die Abb. 3.2 C zeigt eine typische Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeils C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb 3.2 D ist die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, dargestellt. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.1.2 Phosphorylierung der der DLK untergeordneten Kinase JNK in Abhängigkeit von der DLK

3.1.2.1 Ermittlung der Halbwertszeit der DLK

Die in die HIT-T15-Zellen eingebrachte siRNA23 interferiert spezifisch mit der DLK-mRNA, wodurch der Gehalt an DLK in den Zellen reduziert wird. Die sich aus dieser Manipulation ergebenden Änderungen der Reaktionsweise der Zellen können dann der Funktion des Proteins zugeordnet werden. Für den Einsatz von DLK-RNAi wurde zunächst die Halbwertszeit der DLK ermittelt, da Proteine mit langen Halbwertszeiten die Effizienz des RNAi-Einsatzes vermindern. Zu diesem Zweck wurden die HIT-T15-Zellen für unterschiedliche Zeiträume (0,5h, 2h, 6h, 12h, 24h) mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (50µg/ml) behandelt. Den Ausgangswert bildeten unbehandelte Zellen. Um die Auswirkungen von Cycloheximid auf die Gesamtproteinmenge abzugleichen, wurden Blots mit GAPDH-Antikörper angefertigt.

In Abb. 3.3 A ist die Auswirkung der Behandlung mit Cycloheximid auf den Proteingehalt der DLK dargestellt. Pfeil A kennzeichnet eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. In Abb. 3.3 B kennzeichnet der Pfeil B die bei 36kDa migrierende GAPDH. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die GAPDH-Proteinmenge unabhängig von der Behandlung mit Cycloheximid bleibt. Zur quantitativen Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung (Abb. 3.3 C) erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der DLK-Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. Den Ausgangswert für die Berechnungen bildeten die unbehandelten Zellen mit $100 \pm 5\%$. Die Behandlung mit Cycloheximid führte zu einer Reduktion des DLK-Proteingehalts auf $77 \pm 3\%$ nach 0,5h, $56 \pm 2\%$ nach 2h, $33 \pm 6\%$ nach 6h, $25 \pm 5\%$ nach 12h und auf $17 \pm 3\%$ nach 24h. Durch die Auswertung dieser Daten wurde die Kinetik der DLK exploriert, deren Halbwertszeit bei 2h und $26\text{min} \pm 24\text{min}$ liegt.

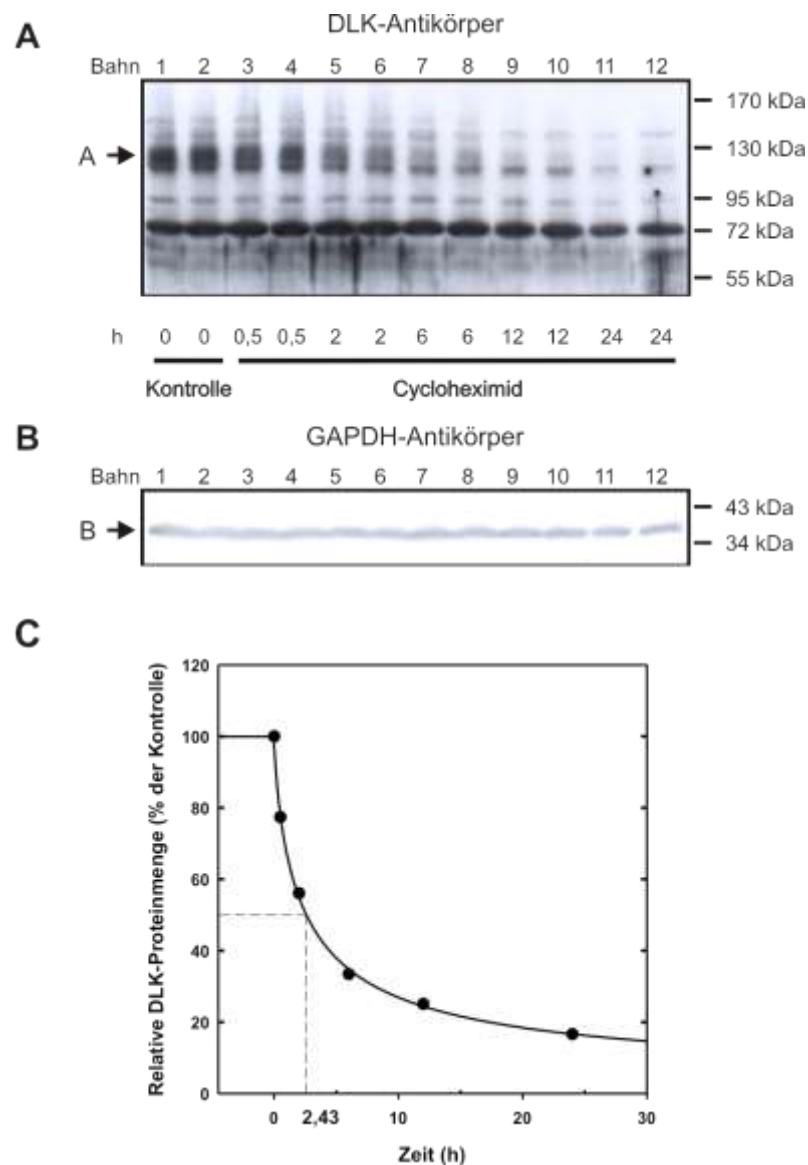


Abb. 3.3: Abschätzung der Halbwertszeit der DLK in den HIT-T15-Zellen. HIT-T15-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 50µg/ml Cycloheximid behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200µg des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden, die der DLK entsprechen, wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.3 A ist mit dem Pfeil A die Bande gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Pfeil B in Abb. 3.3 B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Der Graph in Abb. 3.3 C zeigt die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung in Form einer angenäherten Kurve der Kinetik der DLK.

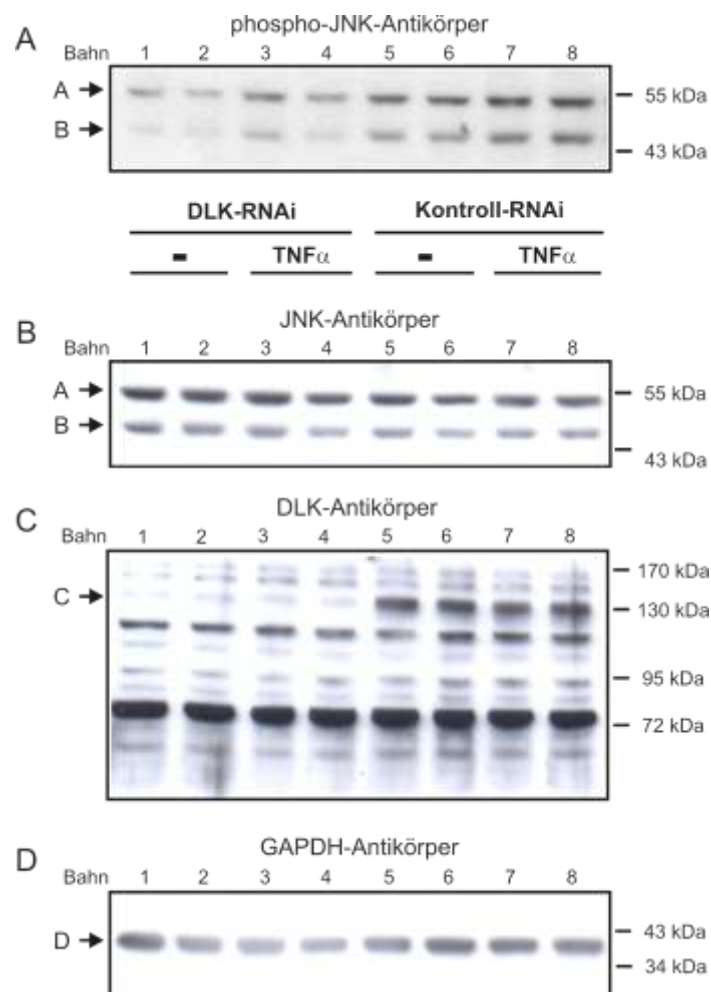
3.1.2.2 JNK-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der DLK

Die MAPK-Kaskade ist ein durch Phosphorylierung regulierter Signalweg, auf dem Signale weitergeleitet, amplifiziert und integriert werden (Levchenko et al. 2000; Weston und Davis 2007). Um zu untersuchen, ob die TNF α -induzierte Aktivierung der MAPK JNK abhängig von der DLK ist, wurde die MAP3K in den HIT-T15-Zellen spezifisch in transienten

Transfektionen durch siRNA vermindert. Durch alternatives Splicen am C-terminalen Ende (distal der katalytischen Domäne) während der Proteinbiosynthese von JNK kommt es zu einer Repräsentation dieses Proteins in zwei Isoformen, die ein Molekulargewicht von 46kDa und 54kDa aufweisen (Kyriakis und Avruch 1996). In diesen Versuchen wurden die Zellen 60 Minuten vor der Ernte mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt, als Positivkontrolle diente Anisomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), welches ebenfalls 60 Minuten vor der Ernte auf die Zellen gegeben wurde. Um mögliche Auswirkungen von $\text{TNF}\alpha$ auf die Gesamtproteinmenge von JNK auszuschließen, wurden als Abgleich jeweils Blots mit phospho-JNK- und JNK-Antikörpern angefertigt. Zur Ermittlung der Effizienz des DLK-RNAi-Einsatzes, resultierend in einer Verminderung der DLK-Proteinmenge, wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) in Western Blots eingesetzt.

In Abb. 3.4 A sind in einem Immunoblot Veränderungen der Phosphorylierung von JNK, hervorgerufen durch den Einsatz von DLK-RNAi und $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung, abgebildet. Die Pfeile A und B kennzeichnen die Banden, die dem publizierten Molekulargewicht der JNK von A, 54kDa und B, 46kDa entsprechen. Eine 60-minütige Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ führte zu einer Zunahme des phospho-JNK-Proteingehalts. In den mit DLK-RNAi transfizierten Zellen war eine Reduktion der JNK-Phosphorylierung zu detektieren. Die Abb. 3.4 B zeigt, dass es durch Transfektion der DLK-RNAi sowie durch Zugabe von 30ng/ml $\text{TNF}\alpha$ zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des Gesamtproteingehalts von JNK kam. Der Proteingehalt der Banden unterschiedlichen Molekulargewichts korreliert miteinander. In Abb. 3.4 C ist die Auswirkung der transienten Transfektion der DLK-RNAi auf den Proteingehalt der DLK dargestellt. Pfeil C kennzeichnet eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. In Abb. 3.4 D kennzeichnet der Pfeil D die bei 36kDa migrierende GAPDH. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die GAPDH-Proteinmenge sowohl unabhängig von der Transfektion als auch von der $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung war. Der quantitativen Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung in Abb. 3.4 E ist zu entnehmen, dass die Phosphorylierung von JNK nach Transfektion von DLK-RNAi reduziert ist. In der Berechnung erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der phospho-JNK-Proteinmenge mit der Gesamt-JNK-Menge. Den Ausgangswert für die Berechnungen bildeten die mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Zellen, die mit Kontroll-RNAi transfiziert worden waren, mit $100 \pm 2\%$. In den Versuchen lag die basale JNK-Phosphorylierung der mit Kontroll-RNAi transfizierten, unbehandelten Zellen bei $59 \pm 4\%$. Die Behandlung mit Anisomycin führte zu einem Anstieg der JNK-Phosphorylierung auf $297 \pm 30\%$ in den nicht

transfzierten und auf $248 \pm 18\%$ in den mit Kontroll-RNAi transfzierten Zellen (nicht abgebildet). Durch Einsatz der DLK-RNAi kam es zu einer Reduktion der JNK-Phosphorylierung auf $53 \pm 8\%$ in der mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Gruppe und auf $26 \pm 8\%$ in der unbehandelten Gruppe. Damit kam es in der mit Kontroll-RNAi transfzierten Gruppe durch die Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ zu einer um 41% gesteigerten JNK-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wurde die JNK-Phosphorylierung bei Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ in der mit DLK-RNAi transfzierten Gruppe nur noch um 27% gesteigert. Wie Abb. 3.4 F zeigt, kam es durch die Transfektion von DLK-RNAi zu einer signifikanten Abnahme des DLK-Proteingehalts. Den Ausgangswert für die Berechnungen bildeten die mit Kontroll-RNAi transfzierten, unbehandelten Zellen mit $100 \pm 8\%$. In den Versuchen konnte durch die Transfektion eine Reduktion der DLK auf $35 \pm 8\%$ in der mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Gruppe und auf $46 \pm 14\%$ in der unbehandelten Gruppe erreicht werden. Bei den mit Kontroll-RNAi transfzierten, mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Zellen lag der DLK-Proteingehalt bei $116 \pm 10\%$.



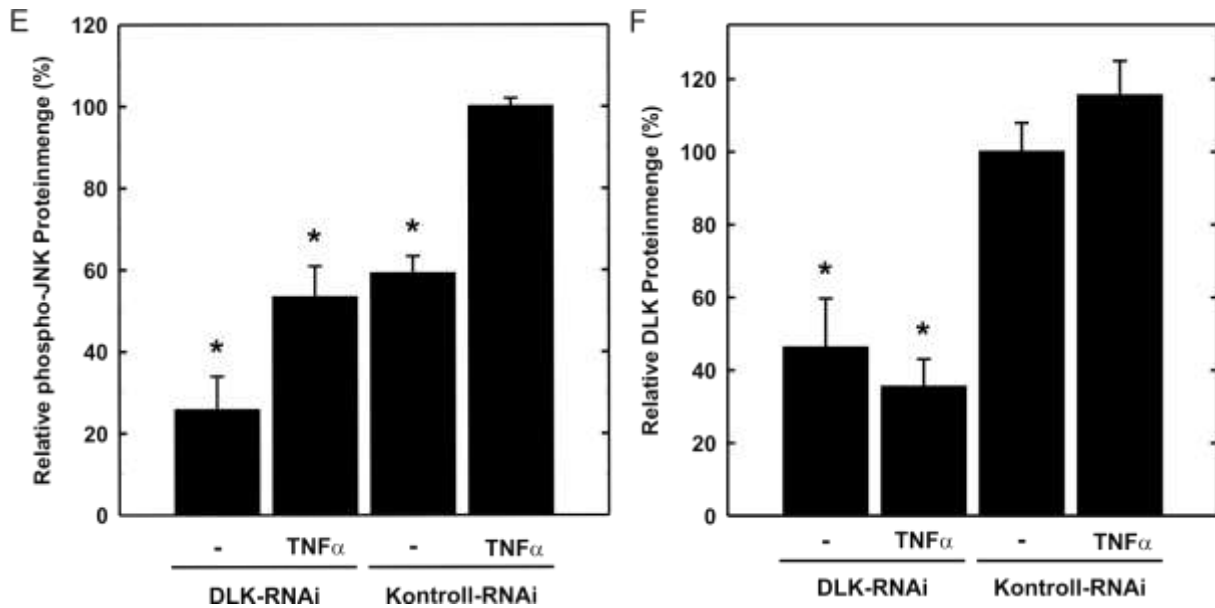


Abb. 3.4: Die Reduktion der zellulären DLK durch siRNA führt zu einer Verminderung der JNK-Phosphorylierung. Es wurden 50pM der DLK-RNAi, sowie der Kontroll-RNAi transient in die HIT-T15-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 1h vor Lyse mit 30ng/ml TNF α behandelt. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.4 A und B sind die mit den Pfeilen A und B die Banden gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der JNK von A, 54kDa und B, 46kDa entsprechen. Pfeil C in Abb. 3.4 C kennzeichnet eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht von 130kDa der DLK entspricht. Pfeil D in Abb. 3.4 D kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Abb. 3.4 E und F zeigen die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.1.3 Wirkung des JNK-Inhibitors SP600125 auf die TNF α -induzierte Steigerung der Kinase-Aktivität der DLK

Nihalani et al. zeigten, dass JNK durch Phosphorylierung von JIP an Thr-103 zu einer verminderten Affinität dieses Gerüstproteins für die DLK führt (Nihalani et al. 2003). Eine Dissoziation der DLK vom JIP-1-Komplex resultiert in einer DLK-Dimerisierung, die mit einer Autophosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase verbunden ist. Um einen Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität der DLK und dem JNK-Signalweg zu evaluieren, wurden in-vitro-Kinase-Assay nach Behandlung mit TNF α unter Hemmung der JNK mit dem Inhibitor SP600125 durchgeführt.

3.1.3.1 Effizienz der Immunpräzipitation mit dem m5F4-DLK-Antikörper

Um die Effizienz der Immunpräzipitation mit dem m5F4-DLK-Antikörper (Hirai et al. 2006) zu überprüfen, wurden 50% der immunpräzipitierten DLK jeweils nach Zugabe von SDS-Laemmli-Stoppuffer durch Erhitzen von den Protein-A-Agarose-Beads gelöst und 50% des Überstandes, sowie jeweils 200µg des nicht immunpräzipitierten Lysats in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und die Proteine im immunologischen Nachweis mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) dargestellt.

Abb. 3.5 zeigt, dass die DLK aus dem Lysat mit dem m5F4-DLK-Antikörper immunpräzipitiert werden konnte. Der Immunoblot stellt die DLK-Anteile dar, die nach der Immunpräzipitation vorhanden waren. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht von 130kDa der DLK entspricht.

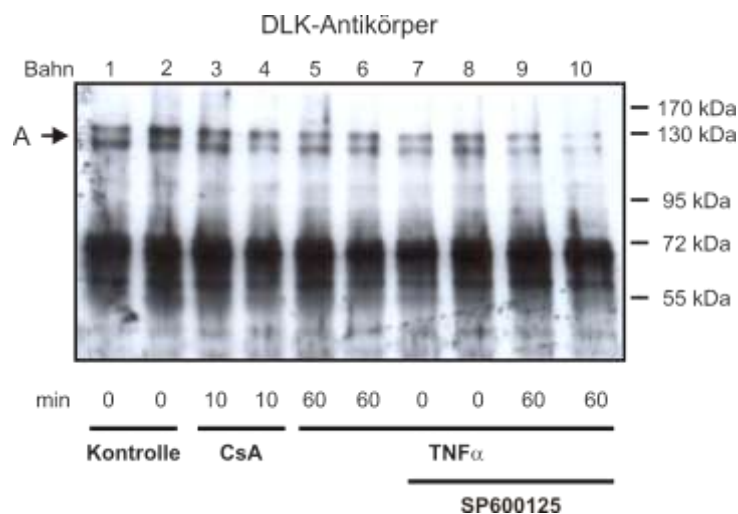


Abb. 3.5: Zelluläre DLK kann mit dem DLK-Antikörper von Hirai et al. (2006) aus dem Betazell-Lysat immunpräzipitiert werden. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten für die Proteincharakterisierung erfolgte die Immunpräzipitation der zellulären DLK mit dem m5F4-DLK-Antikörper (Hirai et al. 2006). Hier dargestellt ist ein Western Blot eines Lysats nach Immunpräzipitation. Der immunologische Nachweis wurde mit einem Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) durchgeführt. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht.

3.1.3.2 Kinase-Assay mit immunpräzipitierter DLK

Um die Wirkung von TNF α auf die enzymatische Aktivität der DLK unter JNK-Inhibition zu untersuchen, wurden Kinase-Assays mit immunpräzipitierter zellulärer DLK durchgeführt.

Die JNK-Inhibition mit 25 μ M SP600125 erfolgte 60 Minuten vor Behandlung mit TNF α . Die entsprechenden Zellen wurden 60 Minuten vor Ernte mit 30ng/ml TNF α behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, des weiteren 10 Minuten vor Ernte mit 5 μ M Ciclosporin A behandelte Zellen. Analog zu den Kinase-Assays in 3.1.1.2 fand die Immunpräzipitation der zellulären DLK aus dem Zelllysate zur Aufreinigung statt. Dafür wurden 2000 μ g des Zelllysates mit dem m5F4-DLK-Antikörper (Hirai et al. 2006) eingesetzt, durch den die DLK an Protein-A-Agarose-Beads gekoppelt wurde. 30-50% der immunpräzipitierten Beads wurden im Kinase-Assay mit [γ -³²P]-ATP verwandt, um eine messbare Phosphorylierung des ebenfalls zugefügten universellen Substrates β -Casein zu gewährleisten. Nach Ablauf der Reaktion wurden 50% des Überstandes dieser Proben denaturiert und mit einem Molekulargewichtsmarker auf einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Einbau des radioaktiv markierten Phosphats in das Casein anhand der γ -Strahlung durch einen Phospho-Imager detektiert.

Die Abb. 3.6 A zeigt das Lysat vor Immunpräzipitation und dient als Kontrolle für das gleichmäßige Beladen des Polyacrylamidgels und das gleichmäßige Einsetzen der Proteine in der Immunpräzipitation und damit in den in-vitro-Kinase-Assay. Der immunologische Nachweis wurde mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) durchgeführt. Die durch Pfeil A markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Es erfolgte ebenfalls ein Abgleich der Proteinmenge durch einen GAPDH-Antikörper wie in Abb. 3.6 B mit dem Pfeil B dargestellt. Die Abb. 3.6 C zeigt eine Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeils C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb. 3.6 D ist die quantitative Auswertung der die Casein-Phosphorylierung repräsentierenden Bande dargestellt. Den Ausgangswert bilden die unbehandelten Zellen mit $100 \pm 6\%$, auf den sich die folgenden Werte beziehen. Die Behandlung mit TNF α resultierte nach 60 Minuten Inkubationszeit in einer signifikanten Aktivitätssteigerung auf $130 \pm 9\%$. Unter Einwirkung des JNK-Inhibitors SP600125 blieb die TNF α -induzierte Zunahme der Aktivität der DLK aus. In dieser Gruppe lag die Aktivität bei $99 \pm 9\%$. Unter alleiniger Einwirkung des JNK-Inhibitors kam es mit $110 \pm 10\%$ zu keiner signifikanten Veränderung der enzymatischen Aktivität.

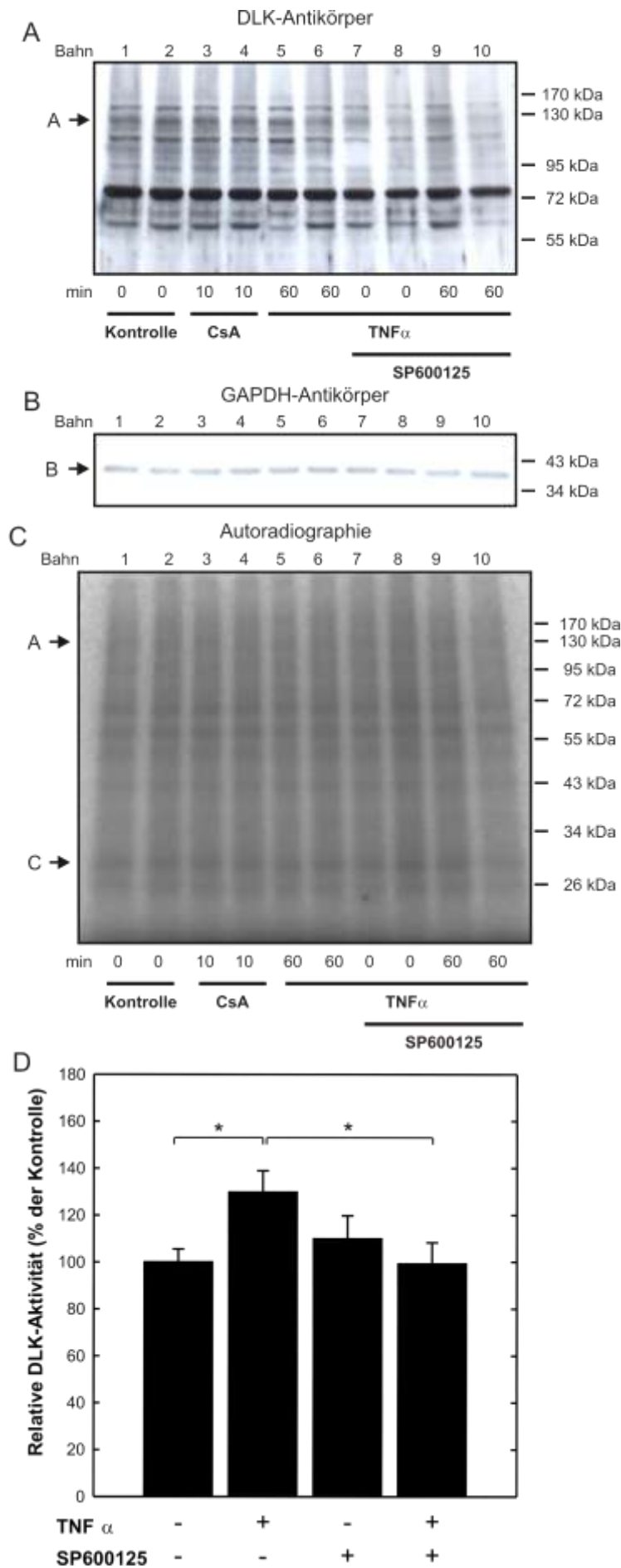


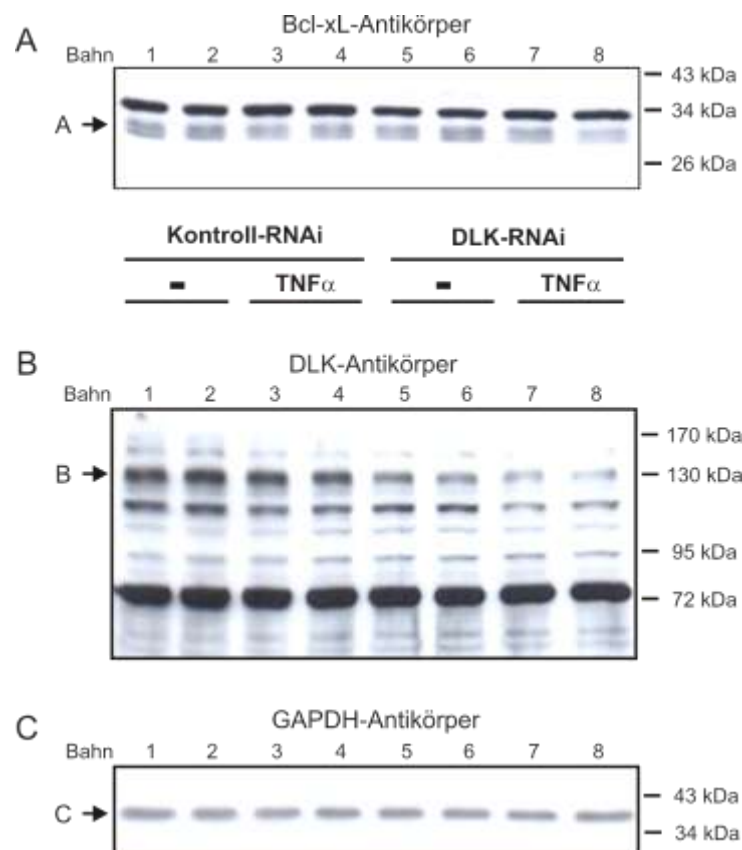
Abb. 3.6 Unter Einwirkung des JNK-Inhibitors SP600125 bleibt die TNF α -induzierte Zunahme der Aktivität der DLK aus. Die JNK-Inhibition mit 25 μ M SP600125 erfolgte 60min vor Behandlung der Zellen mit TNF α . Die entsprechenden Zellen wurden 60min vor Ernte mit 30ng/ml TNF α behandelt. Die enzymatische Aktivität der immunpräzipitierten DLK wurde in einem in-vitro-Kinase-Assay bestimmt. Dargestellt sind in 3.6 A und B Western Blots, die zum Nachweis eines gleichmäßigen Einsetzens der Proteinmenge für die Immunpräzipitation mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) und GAPDH durchgeführt wurden. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Die bei 36kDa migrierende GAPDH ist mit dem Pfeil B markiert. Die Abb. 3.6 C zeigt eine typische Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeils C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb 3.6 D ist die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Versuchen, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, dargestellt. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.1.4 TNF α -induzierte Apoptose in Abhängigkeit von der DLK

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Überexpression der DLK in HIT-T15-Zellen zur Apoptose führt (Plaumann et al. 2008). Als ein Faktor, der Zellen vor einer TNF α -induzierten Apoptose schützt, gilt das antiapoptotische Protein Bcl-xL (Rath und Aggarwal 1999). Dieses Protein gehört zu der B-cell-lymphoma-Familie (Bcl), die an der Regulation der Integrität der mitochondrialen Membran beteiligt sind, welche eine zentrale Rolle im Rahmen der Apoptose spielt (Assuncao Guimaraes und Linden 2004). In den HIT-T15-Zellen sollte der Einfluss der DLK auf die Apoptoserate in Folge der Behandlung mit TNF α untersucht werden. Hierzu wurde DLK-RNAi eingesetzt, um die DLK-Menge in den Zellen zu vermindern. Die Behandlung der HIT-T15-Zellen mit 30ng/ml TNF α erfolgte 24 Stunden vor der Ernte.

In Abb. 3.7 A sind in einem Immunoblot die Veränderungen der Proteinmenge von Bcl-xL, hervorgerufen durch den Einsatz von DLK-RNAi und TNF α -Behandlung, abgebildet. Der Pfeil A kennzeichnet die Bande, die dem publizierten Molekulargewicht des Bcl-xL von 30kDa entspricht. Eine 24-stündige Inkubation mit TNF α führte zu einer Abnahme des Bcl-xL-Proteingehalts. In den mit DLK-RNAi transfizierten Zellen war ebenfalls eine Reduktion zu detektieren. In Abb. 3.7 B ist die Auswirkung der transienten Transfektion der DLK-RNAi auf den Proteingehalt der DLK dargestellt. Pfeil B kennzeichnet eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht von 130kDa der DLK entspricht. Abb. 3.7 C stellt die Wirkungen der transienten Transfektion der DLK-RNAi und der Behandlung mit 30ng/ μ l

TNF α auf GAPDH dar. Pfeil C kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die GAPDH-Proteinmenge unabhängig sowohl von der Transfektion als auch von der TNF α -Behandlung bleibt. Der quantitativen Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung in Abb. 3.7 D ist zu entnehmen, dass es durch Behandlung mit TNF α zu einer Reduktion der Proteinmenge des antiapoptisch wirkenden Bcl-xL kam. In der Berechnung erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der Bcl-xL-Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. Ausgehend von den mit Kontroll-RNAi behandelten Zellen mit $100 \pm 2\%$ führte TNF α zu einer signifikanten Reduktion auf $82 \pm 5\%$. Durch die Transfektion der DLK-RNAi kam es zu einer Abnahme der Proteinmenge des Bcl-xL auf $81 \pm 6\%$ in der unbehandelten Gruppe und auf $69 \pm 11\%$ in der mit TNF α behandelten Gruppe. Die Abb. 3.7 E zeigt, dass es, ausgehend von der unbehandelten Gruppe mit $100 \pm 2\%$, durch transiente Transfektion von DLK-RNAi zu einer signifikanten Abnahme des DLK-Proteingehalts kommt. In den Versuchen konnte eine Reduktion der DLK auf $40 \pm 9\%$ in der unbehandelten Gruppe und auf $24 \pm 5\%$ in der mit TNF α behandelten Gruppe erreicht werden. Die Behandlung mit TNF α über 24 Stunden führte ebenfalls zu einer Abnahme des Proteingehalts auf $72 \pm 2\%$.



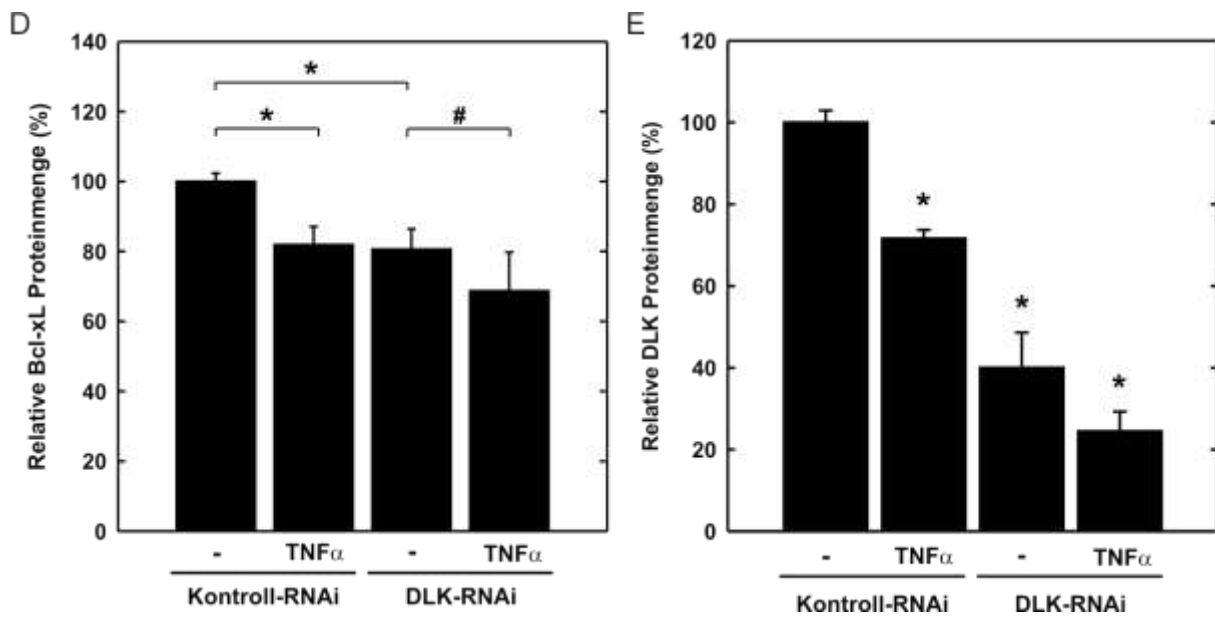


Abb. 3.7: Die Reduktion der zellulären DLK durch siRNA führt zu einer Verminderung des Effektes von TNF α auf den Bcl-xL-Proteingehalt. Es wurden 50pM der DLK-RNAi, sowie der Kontroll-RNAi transient in die HIT-T15-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24h vor Lyse mit 30ng/ml TNF α behandelt. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 400 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.7 A kennzeichnet der Pfeil A die Bande, die dem publizierten Molekulargewicht des Bcl-xL von 30kDa entspricht und sich wie in der Literatur bereits gezeigt als Doppelbande darstellt (Hui et al. 2003). Durch Pfeil B ist in Abb. 3.7 B eine Bande gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Pfeil C in Abb. 3.7 C kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Abb. 3.7 D und E zeigen die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. # bedeutet, dass es zu keiner signifikanten Änderung kam. ($p \leq 0,05$)

3.2 Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β auf die DLK

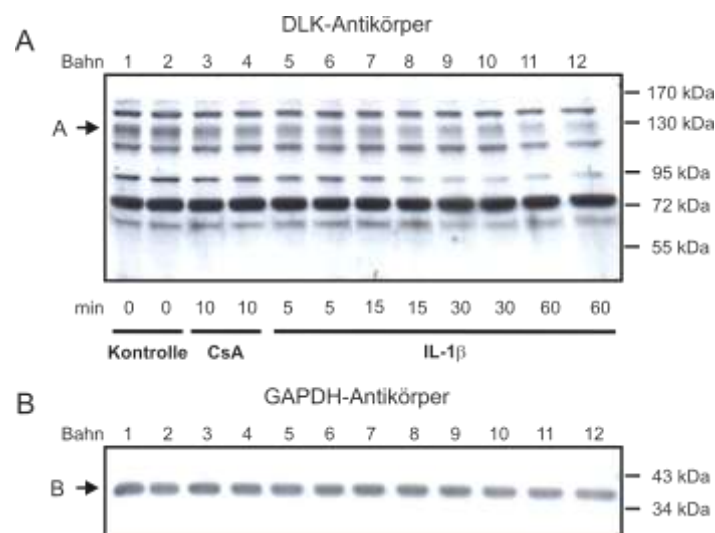
Eine vermehrte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β durch die Betazellen im Pankreas führt zu einer Steigerung der Apoptose dieser Zellen (Maedler et al. 2002). Da durch eine Überexpression der Dual-leucine-zipper-bearing kinase eine gesteigerte Apoptose in der pankreatischen Betazelllinie HIT-T15 nachgewiesen werden konnte (Plaumann et al. 2008), wurde die Wirkung von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität der Dual-leucine-zipper-bearing kinase untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kinase Assays mit immunpräzipitierter zellulärer DLK durchgeführt. In weiteren Versuchen wurde die Auswirkung einer Behandlung mit IL-1 β auf die Phosphorylierung der der DLK untergeordneten Kinase JNK evaluiert.

3.2.1 Die Wirkung von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität der DLK in einer pankreatischen Betazelllinie

Um die Wirkung von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität der DLK zu untersuchen, wurden, analog zu den Versuchen mit TNF α (vgl. 3.1.1), Kinase-Assays mit immunpräzipitierter zellulärer DLK durchgeführt. HIT-T15-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (5min, 15min, 30min, 60min vor Ernte) mit 10ng/ml IL-1 β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, des weiteren 10 Minuten vor der Ernte mit 5 μ M Ciclosporin A behandelte Zellen. Nach Zellyse und Herstellung von Zellextrakten für die Proteincharakterisierung erfolgte die Immunpräzipitation, in der 2000 μ g des Zell-Lysates mit einem gegen die 223 C-terminalen AS der DLK gerichteten Antikörper (Holzman et al. 1994) eingesetzt wurden, durch den die DLK an Protein-A-Agarose-Beads gekoppelt wurde. 30-50% der immunpräzipitierten Beads wurden im Kinase Assay mit [γ -³²P]-ATP verwandt, um eine messbare Phosphorylierung des ebenfalls zugefügten universellen Substrates β -Casein zu gewährleisten. Nach Ablauf der Reaktion wurden 50% des Überstandes dieser Proben denaturiert und mit einem Molekulargewichtsmarker auf einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Einbau des radioaktiv markierten Phosphats in das Casein anhand der γ -Strahlung durch einen Phospho-Imager detektiert.

Die Abb. 3.8 A zeigt das Lysat vor Immunpräzipitation und dient als Kontrolle für das gleichmäßige Beladen des Polyacrylamidgels und das gleichmäßige Einsetzen der Proteine in der Immunpräzipitation und damit in den in-vitro-Kinase-Assay. Der immunologische Nachweis wurde mit dem Holzman-DLK-Antikörper (1994) durchgeführt. Die durch Pfeil A

markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Es erfolgte ebenfalls ein Abgleich der Proteinmenge durch einen GAPDH-Antikörper wie in Abb. 3.8 B mit dem Pfeil B dargestellt. Die Abb. 3.8 C zeigt eine Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeils C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb. 3.8 D ist die quantitative Auswertung der die Casein-Phosphorylierung repräsentierenden Bande dargestellt. Den Ausgangswert bildeten die unbehandelten Zellen mit $100 \pm 5\%$, auf den sich die folgenden Werte beziehen. Eine 10-minütige Behandlung mit $5\mu\text{M}$ CsA führte zu einer signifikanten DLK-Aktivitäts-Zunahme auf $155 \pm 19\%$. Bei den mit IL- 1β behandelten Zellen lag die enzymatische Aktivität nach fünf Minuten Inkubationszeit bei $132 \pm 15\%$, nach 15 Minuten bei $113 \pm 21\%$, nach 30 Minuten bei $129 \pm 18\%$ und nach 60 Minuten bei $126 \pm 24\%$. Die Behandlung der Zellen mit IL- 1β führt innerhalb der gewählten Zeitintervalle zu keiner signifikanten Steigerung der enzymatischen Aktivität der DLK.



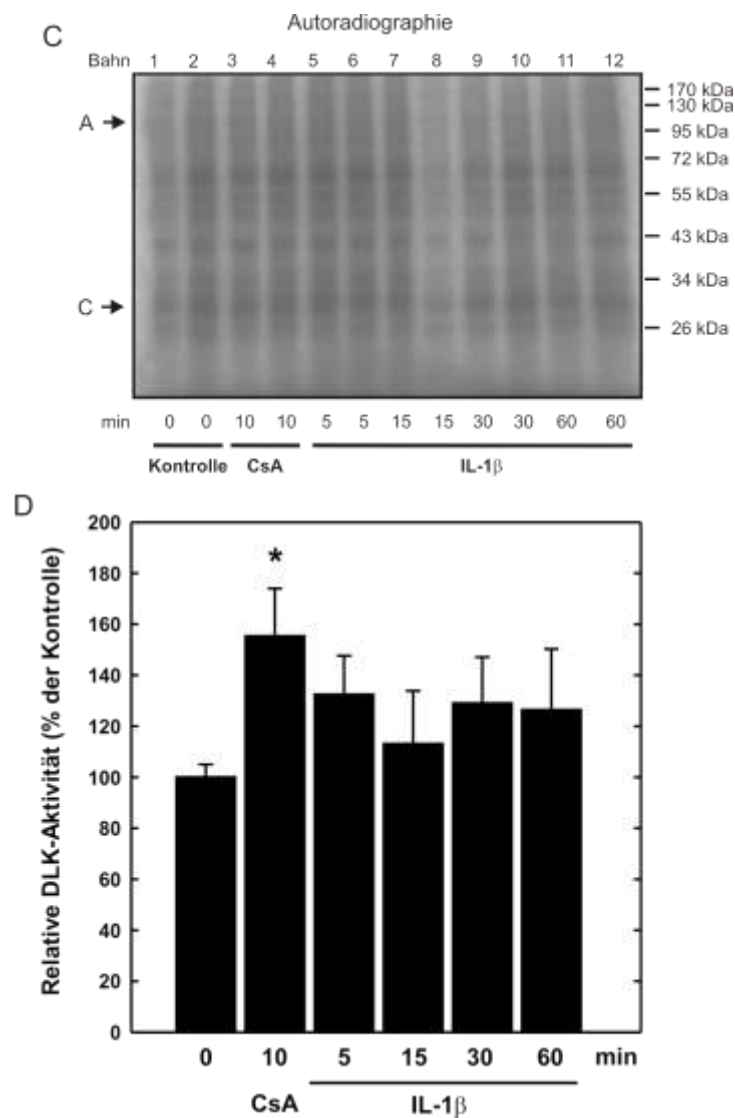


Abb. 3.8 Die enzymatische Aktivität der DLK wird durch Behandlung mit IL-1 β zu den gewählten Zeitintervallen nicht gesteigert. Nach der Behandlung mit 10ng/ml IL-1 β zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die enzymatische Aktivität der immunpräzipitierten DLK in einem in-vitro-Kinase-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 5 μ M Ciclosporin A eingesetzt. Dargestellt sind in 3.8 A und B Western Blots, die zum Nachweis eines gleichmäßigen Einsetzens der Proteinmenge für die Immunpräzipitation mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) und GAPDH durchgeführt wurden. Pfeil A repräsentiert eine Bande, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Die bei 36kDa migrierende GAPDH ist mit dem Pfeil B markiert. Die Abb. 3.8 C zeigt eine typische Autoradiographie nach Durchführung eines in-vitro-Kinase-Assays mit dem immunpräzipitierten Protein. Die Intensität der Banden korreliert mit dem Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in das entsprechende Protein. Der Pfeil A markiert eine der Autophosphorylierung der DLK entsprechende Bande bei 130kDa. Auf Höhe des Pfeil C ist die Phosphorylierung des eingesetzten Substrates Casein bei 30kDa zu erkennen. In Abb 3.8 D ist die quantitative Auswertung von fünf unabhängigen Versuchen, die alle in Doppelbestimmung durchgeführt wurden, dargestellt. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.2.2 Phosphorylierung der der DLK untergeordneten Kinase JNK

Wie bereits beschrieben, steht am Ende der MAPK-Kaskade die JNK, deren Aktivitätsstatus durch Phosphorylierung reguliert wird. Um die Auswirkung von IL-1 β auf die der DLK untergeordneten JNK in den HIT-T15-Zellen zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus dieser Kinase in einer Zeitreihe untersucht. HIT-T15-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (5min, 15min, 30min, 60min vor Ernte) mit 10ng/ml IL-1 β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, des weiteren als Positivkontrolle 60 Minuten vor Ernte mit Anisomycin (50 μ g/ml) und mit 30ng/ml TNF α behandelte Zellen (Cano et al. 1994; Aguirre et al. 2000). Um mögliche Auswirkungen von IL-1 β auf die Gesamtproteinmenge von JNK auszuschließen, wurden als Abgleich jeweils Blots mit phospho-JNK- und JNK-Antikörper angefertigt.

In Abb. 3.9 A ist in einem Immunoblot die Phosphorylierung von JNK in Abhängigkeit von der Behandlung mit IL-1 β , TNF α und Anisomycin nach den angegebenen Zeitintervallen abgebildet. Die Pfeile A und B kennzeichnen die Banden, die dem publizierten Molekulargewicht der phospho-JNK von A (54kDa) und B (46kDa) entsprechen. In Abb. 3.9 B ist die Auswirkung der Behandlung mit IL-1 β auf den Gesamtproteingehalt von JNK dargestellt. Auch hier sind mit den Pfeilen A und B die Banden gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der JNK von A (54kDa) und B (46kDa) entsprechen. Die signifikante Abnahme des Gesamtproteingehalts von JNK nach 30-minütiger Behandlung mit IL-1 β wurde in den Berechnungen berücksichtigt. In Abb. 3.9 C kennzeichnet der Pfeil C die bei 36kDa migrierende GAPDH. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die GAPDH-Proteinmenge unabhängig von der IL-1 β -Behandlung bleibt. Der quantitativen Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung in Abb. 3.9 D ist zu entnehmen, dass die Behandlung mit IL-1 β in den HIT-T15-Zellen zu einer Phosphorylierung von JNK führt. In der Berechnung erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der phospho-JNK-Proteinmenge mit der Gesamt-JNK-Menge. Den Ausgangswert bilden die unbehandelten Zellen mit $100 \pm 3\%$, auf den sich die folgenden Werte beziehen. Die IL-1 β -induzierte JNK-Phosphorylierung beläuft sich nach einer Behandlung von fünf Minuten auf $143 \pm 18\%$, nach 15 Minuten auf $253 \pm 55\%$, nach 30 Minuten auf $308 \pm 36\%$ und nach 60 Minuten auf $250 \pm 29\%$. Anisomycin führt nach 60-minütiger Behandlung zu einem Anstieg des phospho-JNK-Gehalts auf $514 \pm 103\%$. Die maximale Steigerung der JNK-Phosphorylierung bis auf das dreifache des Ausgangswertes zeigt sich somit nach 30-minütiger Behandlung mit IL-1 β .

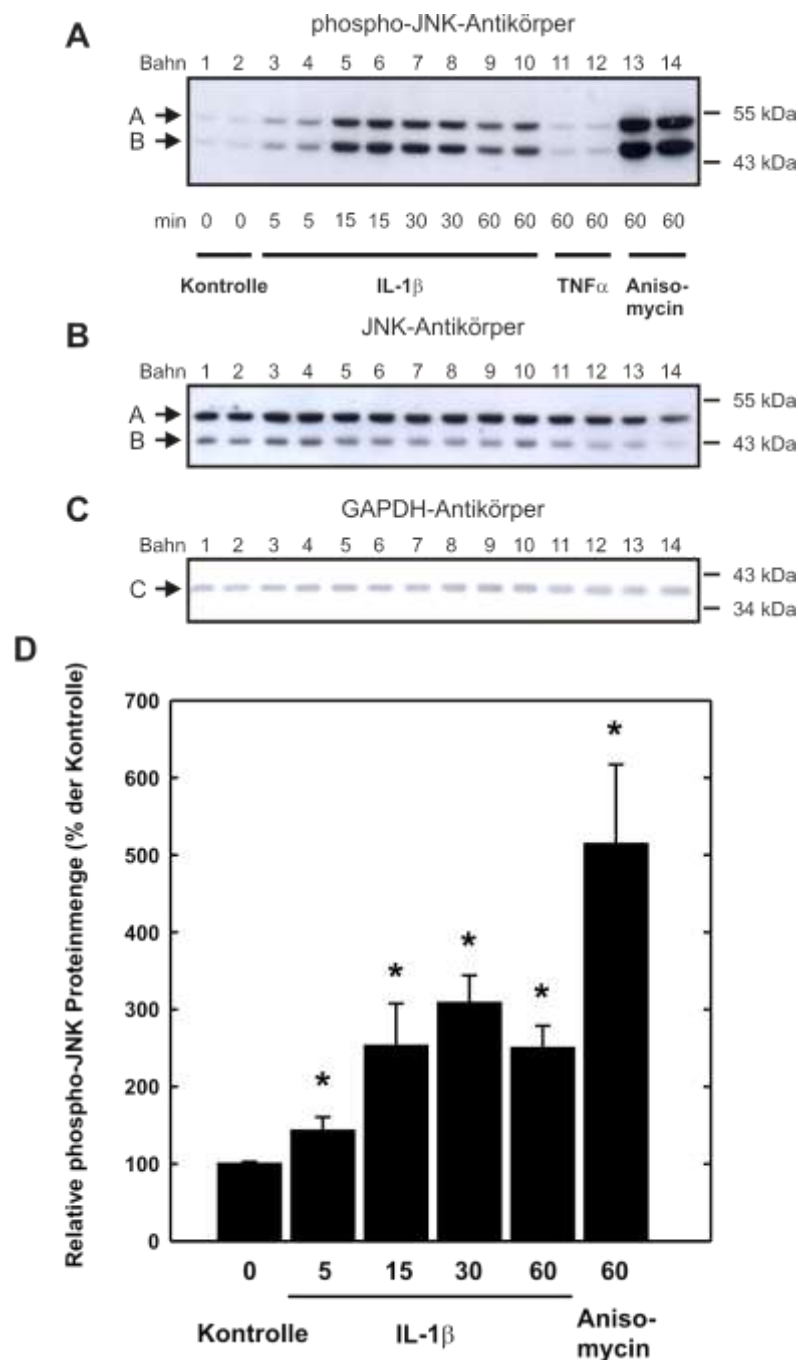


Abb. 3.9: IL-1 β führt zu einer Zunahme der JNK-Phosphorylierung in den HIT-T15-Zellen. HIT-T15-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 10ng/ml IL-1 β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, des weiteren als Positivkontrolle 60min vor Ernte mit Anisomycin (50 μ g/ml) behandelte Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.9 A und B sind mit den Pfeilen A und B die Banden gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der phospho-JNK/JNK von A (54kDa) und B (46kDa) entsprechen. Pfeil C in Abb. 3.9 C kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Der Graph in Abb. 3.9 D zeigt die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.3 Auswirkung der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die Proteinmenge der DLK in den HIT-T15-Zellen

Bei der Auswertung der durchgeführten Versuche kam wiederholt der Eindruck auf, dass die DLK-Proteinmenge durch Behandlung mit den Zytokinen TNF α und IL-1 β reduziert würde. Um die Wirkung der Zytokine auf den Proteingehalt der DLK in den HIT-T15-Zellen zu untersuchen, wurden Versuchsreihen zur Quantifizierung und Ermittlung der Ursache dieser Reduktion durchgeführt.

3.3.1 Quantifizierung der Zytokin-induzierten Reduktion der DLK

Zur Quantifizierung der Zytokin-induzierten Reduktion wurde der Proteingehalt der DLK in Western Blots untersucht. HIT-T15-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume (0,5h, 2h, 6h, 12h, 24h) mit 30ng/ml TNF α bzw. 10ng/ml IL-1 β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Zur Ermittlung der Verminderung der DLK-Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus der DLK (Holzman et al. 1994) in Immunoblots eingesetzt. Desweiteren wurden Blots mit GAPDH-Antikörper angefertigt, um eine mögliche Beeinflussung der Gesamtproteinmenge durch die Zytokine ausschließen zu können.

Abb. 3.10 stellt die Auswirkungen der Behandlung mit dem jeweiligen Zytokin auf die DLK-Proteinmenge gegenüber. In Abb. 3.10 A und B sind Immunoblots abgebildet, die eine Reduktion der DLK nach den angegebenen Zeitintervallen erkennen lassen. Die durch die Pfeile A markierten Banden bei 130kDa entsprechen der publizierten Größe der DLK. In Abb. 3.10 C und D kennzeichnen die Pfeile B die bei 36kDa migrierende GAPDH. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die GAPDH-Proteinmenge durch die Behandlung mit den Zytokinen nicht signifikant beeinflusst wird. Die quantitativen Auswertungen von je zwei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung sind den Abb. 3.10 E und F zu entnehmen. In den Berechnungen erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der DLK-Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. Wie der Graph in Abb. 3.10 E erkennen lässt, kommt es zu einer Abnahme des DLK-Proteingehalts unter TNF α -Einwirkung, ausgehend von den unbehandelten Zellen mit $100 \pm 7\%$. Der DLK-Proteingehalt lag nach 0,5 Stunden Behandlung mit TNF α bei $95 \pm 2\%$, nach zwei Stunden bei $104 \pm 5\%$ und sank in der Folge ab auf $71 \pm 6\%$ nach sechs Stunden, $79 \pm 2\%$ nach 12 Stunden und auf $71 \pm 1\%$ nach 24 Stunden.

Auch die IL-1 β -Behandlung führte zu einer Reduktion der DLK, abgebildet in Abb. 3.11 F. Ausgehend von den unbehandelten Zellen mit $100 \pm 1\%$, nahm der Proteingehalt nach 0,5h Behandlung mit IL-1 β auf $78 \pm 3\%$, nach zwei Stunden auf $63 \pm 3\%$, nach sechs Stunden $43 \pm 7\%$, nach 12 Stunden auf $44 \pm 8\%$ und nach 24 Stunden auf $30 \pm 3\%$ ab.

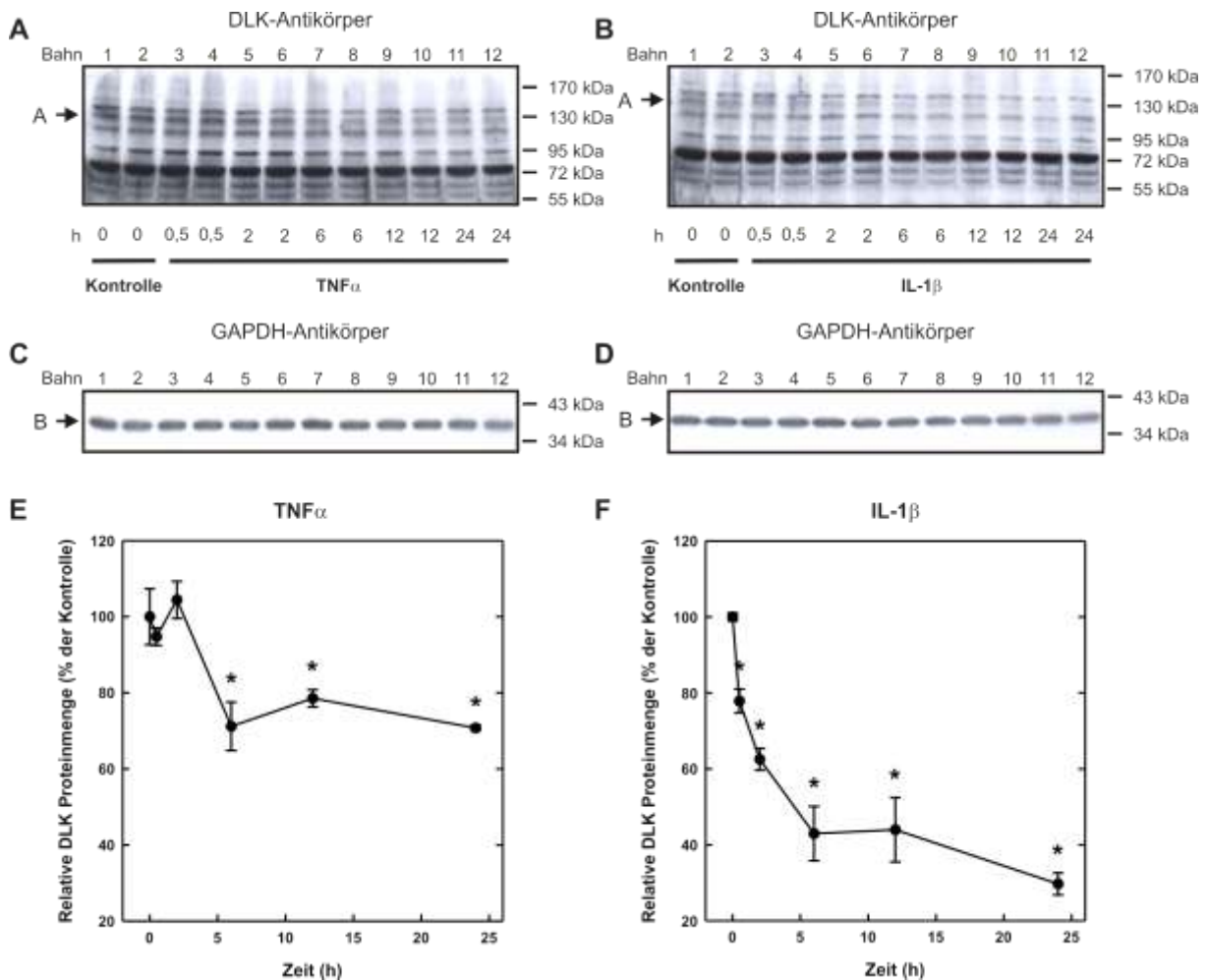


Abb. 3.10: Die Zytokine TNF α und IL-1 β führen zu einer Reduktion des DLK-Proteingehalts in den HIT-T15-Zellen. HIT-T15-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 30ng/ml TNF α bzw. 10ng/ml IL-1 β behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.10 A und B sind mit den Pfeilen A die Banden gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entsprechen. Pfeil B in den Abb. 3.10 C und D kennzeichnen die bei 36kDa migrierende GAPDH. Die Graphen in Abb. 3.10 E und F zeigen die quantitativen Auswertungen von zwei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.3.2 Zytokin-induzierte Reduktion der DLK bei Inhibition des Proteasoms

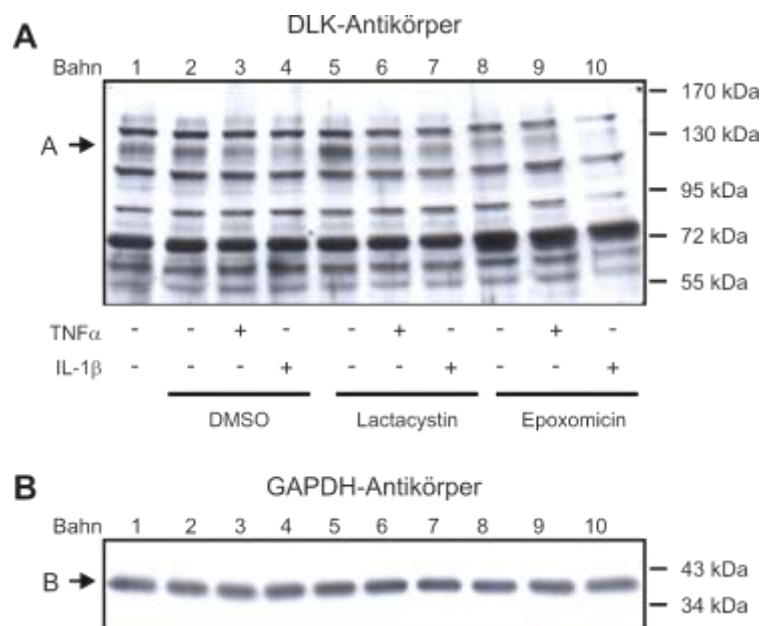
Die Mehrheit der intrazellulären Proteine wird auf dem Ubiquitin-Proteasom-Pfad abgebaut. Die designierten Proteine werden durch gezielte Ubiquitin-Markierung, deren Schlüsselenzym die E3-Ubiquitin-Ligase ist, selektiv identifiziert und daraufhin im 26S-Proteasom in Peptide gespalten (Lecker et al. 2006). Der 26S-Proteasom-Komplex besteht aus zwei Hauptstrukturen dem 20S *Core-Protein* (CP), welches die Protease-Untereinheiten enthält, und dem 19S *Regulatory-Particle* (RP), das die Funktion des CP reguliert (Glickman und Ciechanover 2002). Um zu untersuchen, ob der Zytokin-induzierten Reduktion der DLK eine verstärkte Degradation des Proteins in den HIT-T15-Zellen zugrunde liegt, wurden in diesem Versuch die Proteasom-Inhibitoren Lactacystin und Epoxomicin eingesetzt (Dick et al. 1996; Meng et al. 1999). Dafür wurde 3 Stunden vor der Behandlung mit den Zytokinen TNF α (30ng/ml) und IL-1 β (10ng/ml), welche 12 Stunden vor der Ernte erfolgte, zunächst die 20S-Komponente des Proteasoms durch 10 μ M Lactacystin bzw. 500nM Epoxomicin gehemmt. Die DLK-Proteinmenge wurde anhand von Immunoblots mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) ermittelt. Um Variationen durch das Auftragen oder durch Auswirkungen auf die Gesamtproteinmenge auszuschließen, wurden ebenfalls Blots mit einem Antikörper gegen GAPDH durchgeführt.

Der in Abb. 3.11 A abgebildete Immunoblot stellt die Auswirkungen der Behandlung mit dem jeweiligen Zytokin bzw. unter Proteasom-Inhibition auf die DLK-Proteinmenge dar. Die durch den Pfeil A markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Durch die Behandlung mit den Zytokinen und den Proteasom-Inhibitoren wurde die GAPDH-Proteinmenge nicht signifikant beeinflusst, wie in Abb. 3.11 B an einem Immunoblot zu erkennen ist. Pfeil B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Für die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung in den Abb. 3.11 C und D erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der DLK- Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. In den Graphen sind die Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%) dargestellt; die Tabelle 3.1 gibt die Werte gruppiert bezogen auf die jeweilige Kontrolle (100%) wieder. In den Graphen (Abb. 3.11 C und D), sowie in der Tabelle 3.1 ist zu erkennen, dass es als Kontrolle in Abwesenheit der Proteasom-Inhibitoren durch die Zytokine reproduzierbar zur Reduktion der DLK-Proteinmenge kommt. Ausgehend von den unbehandelten Zellen, die gleich 100% gesetzt wurden, führte die 12-stündige Behandlung mit TNF α zu einer Reduktion der DLK auf $78 \pm 7\%$ und die Behandlung mit IL-1 β zu einer Reduktion auf $67 \pm 7\%$. Abb. 3.11 C zeigt die Auswirkung der Proteasom-Inhibition mit

Lactacystin auf die DLK-Proteinmenge. Lactacystin führt, ausgehend von den unbehandelten Zellen, zu einer Zunahme der DLK-Menge auf $136 \pm 12\%$. Unter zusätzlicher Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ lag die DLK-Menge bei $101 \pm 17\%$ und wurde unter $\text{IL-1}\beta$ auf $87 \pm 14\%$ signifikant reduziert. Wie der Graph in Abb. 3.11 D erkennen lässt, kommt es zu einer starken Abnahme des DLK-Proteingehalts unter Einwirkung von Epoxomicin auf $52 \pm 7\%$, ausgehend von den unbehandelten Zellen. Die DLK-Menge lag unter zusätzlicher Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ bei $42 \pm 6\%$ und mit $\text{IL-1}\beta$ bei $31 \pm 8\%$.

Tabelle 3.1: DLK-Degradation bei Inhibition des Proteasoms (Bezugsgrößen als 100%)

Behandlung	DMSO	Lactacystin	Epoxomicin
Kontrolle	100%	100%	100%
$\text{TNF}\alpha$	$78 \pm 7\%$	$89 \pm 9\%$	$82 \pm 4\%$
$\text{IL-1}\beta$	$67 \pm 7\%$	$73 \pm 6\%$	$51 \pm 14\%$



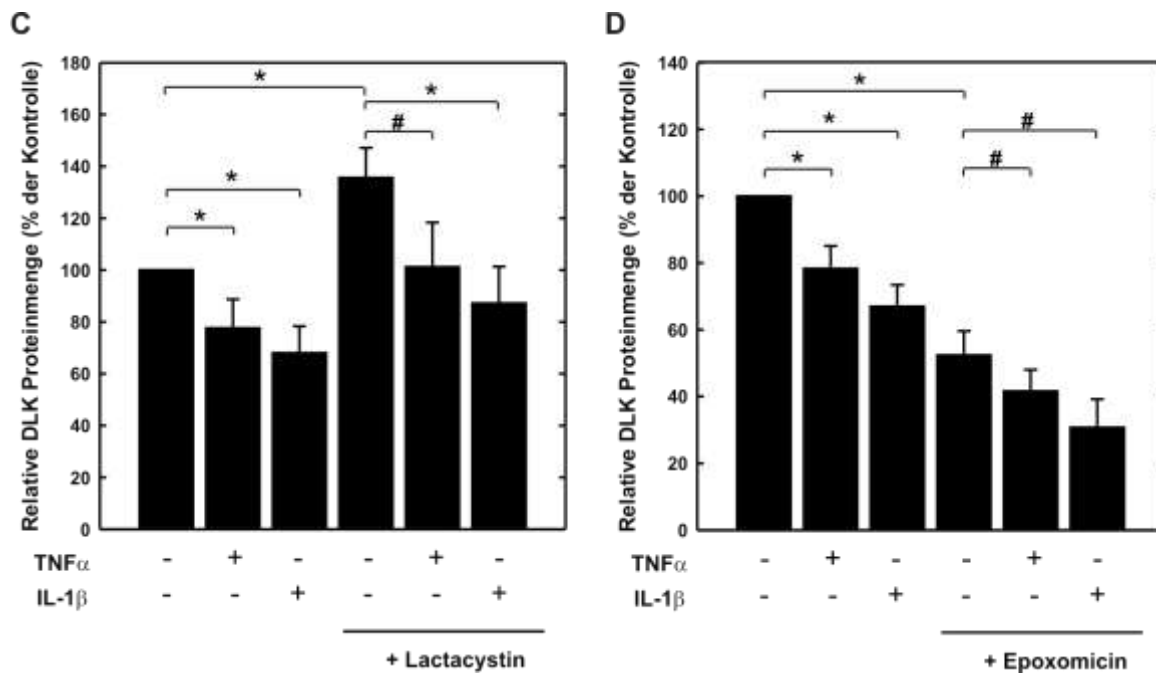


Abb. 3.11: Die Reduktion der DLK durch die Zytokine TNF α und IL-1 β wird durch Proteasom-Inhibition in den HIT-T15-Zellen vermindert. In HIT-T15-Zellen wurde 3h vor der Behandlung mit den Zytokinen TNF α (30ng/ml) und IL-1 β (10ng/ml), welche 12h vor der Ernte erfolgte, zunächst die 20S-Komponente des Proteasoms durch 10 μ M Lactacystin bzw. 500nM Epoxomicin gehemmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.11 A ist mit dem Pfeil A die Bande gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Pfeil B in der Abb. 3.11 B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Die Graphen in Abb. 3.11 C und D zeigen die quantitativen Auswertungen von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. # bedeutet, dass es zu keiner signifikanten Änderung kam. ($p \leq 0,05$)

3.3.3 Zytokin-induzierte Reduktion der DLK bei Inhibition der Proteinsynthese

Der Prozess der Proteinbiosynthese gliedert sich in zwei Hauptbestandteile, die Transkription, bei der ein zu einem DNA-Strang komplementäres RNA-Molekül mit den Informationen zur Synthese eines Proteins geschaffen wird, und die Translation, bei der in den Ribosomen die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in eine Aminosäuresequenz erfolgt. Der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid greift durch Hemmung der Vorgänge am Ribosomen in diesen Regelkreis ein (Obrig und Gottlieb 1970). In diesem Versuch sollte der Einfluss einer Hemmung der Proteinbiosynthese auf die Zytokin-induzierte Reduktion der DLK untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Stunde vor der Behandlung mit TNF α und IL-1 β die Proteinsynthese mit 50 μ g/ml Cycloheximid gehemmt. 30ng/ml TNF α und 10ng/ml IL-1 β wurden sechs Stunden vor der Ernte auf die jeweiligen Zellen gegeben. Die DLK-Proteinmenge wurde anhand von Immunoblots mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al.

1994) ermittelt. Um Variationen durch das Auftragen oder durch Auswirkungen auf die Gesamtproteinmenge auszuschließen, wurden ebenfalls Blots mit einem Antikörper gegen GAPDH durchgeführt.

In dem in Abb. 3.12 A abgebildeten Immunoblot sind die Auswirkungen der Behandlung mit dem jeweiligen Zytokin bzw. unter Cycloheximid auf die DLK-Proteinmenge dargestellt. Die durch den Pfeil A markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Durch die Behandlung mit Cycloheximid wurde die GAPDH-Proteinmenge leicht reduziert, wie in Abb. 3.12 B an einem Immunoblot zu erkennen ist. Pfeil B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung ist der Abb. 3.12 C sowie der Tabelle 3.2 zu entnehmen. In dem Graph sind die Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%) dargestellt; die Tabelle 3.2 gibt die Werte gruppiert bezogen auf die jeweilige Kontrolle (100%) wieder. In den Berechnungen erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der DLK-Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. Ausgehend von den unbehandelten Zellen mit $100 \pm 8\%$ führte die 6-stündige Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ zu einer Reduktion der DLK auf $74 \pm 5\%$ und die Behandlung mit $\text{IL-1}\beta$ zu einer Reduktion auf $63 \pm 8\%$. Unter Einwirkung von Cycloheximid kam es zu einer Reduktion der DLK-Menge auf $44 \pm 9\%$. Unter zusätzlicher Behandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ lag die DLK-Menge bei $44 \pm 13\%$ und unter $\text{IL-1}\beta$ bei $52 \pm 8\%$.

Tabelle 3.2: DLK-Degradation bei Inhibition der Proteinsynthese (Bezugsgrößen als 100%)

Behandlung	DMSO	Cycloheximid
Kontrolle	$100 \pm 8\%$	$100 \pm 11\%$
TNFα	$74 \pm 5\%$	$96 \pm 16\%$
IL-1β	$63 \pm 8\%$	$100 \pm 12\%$

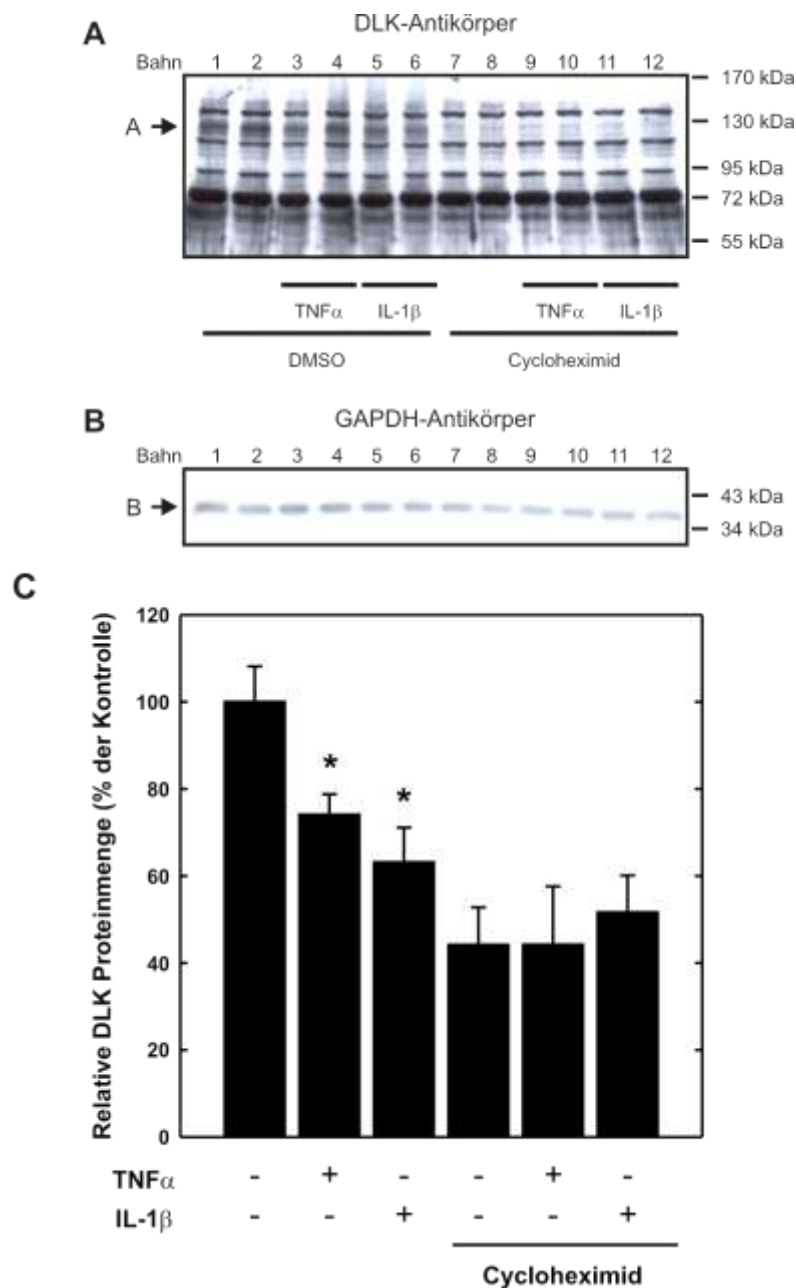


Abb. 3.12: Unter Behandlung mit Cycloheximid kommt es zu keiner Reduktion der DLK durch die Zytokine TNF α und IL-1 β in den HIT-T15-Zellen. In HIT-T15-Zellen wurde 1h vor der Behandlung mit den Zytokinen TNF α (30ng/ml) und IL-1 β (10ng/ml), welche 6h vor der Ernte erfolgte, zunächst die Proteinsynthese mit 50 μ g/ml Cycloheximid gehemmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.12 A ist mit dem Pfeil A die Bande gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Pfeil B in der Abb. 3.12 B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Der Graph in Abb. 3.12 C zeigt die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

3.3.4 Zytokin-induzierte Degradation der DLK bei Kinase-toten Mutanten

Ob die Zytokin-induzierte Reduktion der DLK abhängig ist von ihrer Funktion als Proteinkinase, sollte in diesem Versuch an Kinase-toten Mutanten untersucht werden. Dafür wurden in den HIT-T15-Zellen durch transiente Transfektionen der DLKwt und die Mutanten DLK K185A bzw. DLK S302A überexprimiert (s. 2.7). Die Behandlung mit 30ng/ml TNF α bzw. 10ng/ml IL-1 β erfolgte 12 Stunden vor der Ernte. Zur Kontrolle dienten sowohl untransfizierte Zellen, als auch Zellen, in denen der DLKwt überexprimiert worden war. Die DLK-Proteinmenge wurde anhand von Western blots mit einem DLK-Antikörper (Holzman et al. 1994) ermittelt. Um Variationen durch das Auftragen oder durch Auswirkungen auf die Gesamtproteinmenge auszuschließen, wurden ebenfalls Blots mit einem Antikörper gegen GAPDH durchgeführt.

In Abb. 3.13 A ist ein Immunoblot abgebildet, der die Auswirkungen der Behandlung mit dem jeweiligen Zytokin bzw. der transienten Transfektion auf die DLK-Proteinmenge darstellt. Die durch den Pfeil A markierte Bande bei 130kDa entspricht der publizierten Größe der DLK. Durch die transiente Transfektion und die Behandlung mit den Zytokinen wurde die GAPDH-Proteinmenge nicht signifikant beeinflusst, wie in Abb. 3.13 B an einem Immunoblot zu erkennen ist. Pfeil B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung ist in Abb. 3.13 C sowie in der Tabelle 3.3 dargestellt. In dem Graph sind die Werte gruppiert auf die jeweilige Kontrolle (100%) bezogen; die Tabelle 3.3 gibt die Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (100%) wieder. In den Berechnungen erfolgte ein Abgleich der gemessenen Werte der DLK-Proteinmenge mit der GAPDH-Menge. Die transiente Transfektion mit den Expressionsvektoren führt zu einer Zunahme der die DLK repräsentierenden Bande (s. Tabelle 3.3 Kontrolle). Ausgehend von den untransfizierten, unbehandelten Zellen, die gleich 100% gesetzt wurden, kam es unter der 12-stündigen Behandlung mit IL-1 β zu einer Reduktion der DLK auf $59 \pm 8\%$ und unter TNF α zu einer Reduktion auf $72 \pm 6\%$. Auch bei den mit dem DLKwt transfizierten Zellen war eine Reduktion der DLK, ausgehend von 100% für die unbehandelten Zellen, unter Behandlung mit IL-1 β auf $75 \pm 5\%$ und mit TNF α auf $78 \pm 6\%$ zu erkennen. Bei den Kinase-toten Mutanten kam es zu keiner Reduktion der DLK durch Behandlung mit den Zytokinen. Bei den Zellen, die die DLK K185A Mutante exprimierten, lag die DLK-Menge unter Behandlung mit IL-1 β , sowie mit TNF α bei $97 \pm 5\%$, ausgehend von der unbehandelten Mutante als 100%. Unter Expression der DLK S302A Mutante lag die DLK-Menge unter

Behandlung mit IL-1 β bei $102 \pm 14\%$ und mit TNF α bei $92 \pm 11\%$, ebenfalls ausgehend von 100% für die unbehandelte Mutante.

Tabelle 3.3: DLK-Degradation bei Kinase-toten Mutanten (Bezugsgröße als 100%)

Behandlung	Untransfiziert	DLKwt	DLK K185A	DLK S302A
Kontrolle	100%	$201 \pm 19\%$	$177 \pm 29\%$	$183 \pm 18\%$
TNF α	$59 \pm 8\%$	$150 \pm 16\%$	$168 \pm 26\%$	$189 \pm 34\%$
IL-1 β	$72 \pm 6\%$	$157 \pm 18\%$	$170 \pm 30\%$	$170 \pm 30\%$

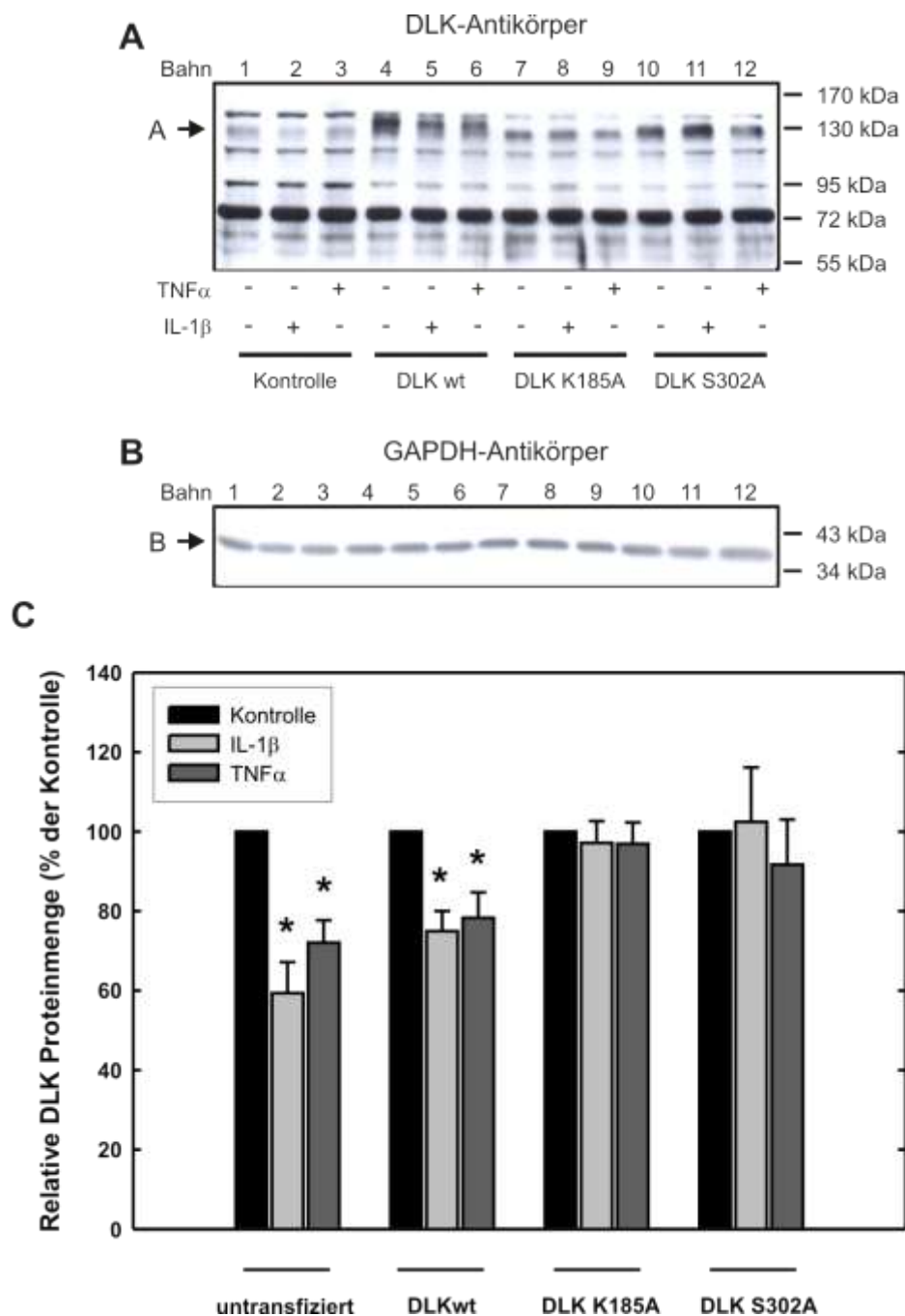


Abb. 3.13: Der Effekt der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die DLK-Proteinmenge wird durch Expression Kinase-toter Mutanten in den HIT-T15-Zellen verhindert. Die transiente Transfektion der jeweiligen DLK-Mutante (3,5 μ g DNA/Versuchsansatz) in die HIT-T15-Zellen erfolgte 1h nach dem Ausplattieren, woraufhin die Zellen für 48h inkubiert wurden. Die Zytokine TNF α (30ng/ml) und IL-1 β (10ng/ml) wurden 12h vor der Ernte auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten die unbehandelten Zellen. Nach Lyse und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 200 μ g des Lysats mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die optische Dichte der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. In Abb. 3.13 A ist mit dem Pfeil A die Bande gekennzeichnet, die dem publizierten Molekulargewicht der DLK von 130kDa entspricht. Es ist zu erkennen, dass die endogene DLK, sowie der DLKwt und DLK S302A als Doppelbande migrierten, während DLK K185A als Einzelbande lief. Pfeil B in der Abb. 3.13 B kennzeichnet die bei 36kDa migrierende GAPDH. Der Graph in Abb. 3.13 C zeigt die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Mit * gekennzeichnete Daten entsprechen einer signifikanten Änderung. ($p \leq 0,05$)

4 Diskussion

Viele Veröffentlichungen zeigen eine Beteiligung der Zytokine TNF α (Uysal et al. 1997; Aguirre et al. 2000 und 2002) und IL-1 β (Maedler et al. 2002 und 2004) als wichtige Komponenten in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Es ist bekannt, dass diese proinflammatorischen Zytokine - vor allem in Kombination - den Übergang zur Apoptose induzieren können (Rabinovitch et al. 1990; Andersen et al. 2000). Eine Beteiligung der MAPK JNK in Apoptose-induzierenden Signalwegen ist gesichert (Davis 2000). Die Rolle der ihr in der MAPK-Signalkasade übergeordneten MAP3K DLK ist bei der Reaktion der Zellen auf verschiedene Stimuli noch weitgehend ungeklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die DLK sowohl die durch Membrandepolarisation als auch die durch die cAMP-sensitive Proteinkinase A (PKA) induzierte transkriptionelle Aktivität von CREB inhibiert (Reddy und Pleasure 1994; Oetjen et al. 2006), eines Transkriptionsfaktors der essentiell ist für die Aufrechterhaltung der Funktion und das Überleben der Betazellen (Oetjen et al. 1994 und 2003; Withers et al. 1998; Jhala et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die Zytokine TNF α und IL-1 β die enzymatische Aktivität der DLK beeinflussen. Des Weiteren wurde die Beteiligung der DLK an der Zytokin-induzierten Aktivierung von JNK und der durch TNF α induzierten Apoptose untersucht. Schließlich konzentrierten sich die Untersuchungen auf die durch Zytokin-Behandlung hervorgerufene Veränderung der DLK-Proteinmenge. Dies ist für das Verständnis der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 von Bedeutung.

4.1 HIT-T15-Zellen als geeignetes Modell für die Untersuchung der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Bei Einsatz einer Tumorzelllinie, die als solche in Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptose-Mechanismen von ihrem Ursprungsgewebe abweicht, muss zunächst geklärt werden, ob ein solches Modell für die Beantwortung der Fragen ausreichend physiologisch ist. Im Falle der pankreatischen permanenten Betazelllinie HIT-T15 konnten wichtige spezifische Merkmale von differenzierten normalen Betazellen nachgewiesen werden: In dieser Betazelllinie erfolgt die Synthese von Proinsulin und die Prozessierung zu Insulin, welches in Membran-gebundenen Speicher-Granula vorliegt, genau wie in normalen Betazellen (Santerre et al. 1981). Eine Exozytose dieser Granula wird durch eine Reihe

physiologischer Stimuli, wie die Behandlung mit Glukose, Aminosäuren, Glukagon und Acetylcholin in adäquater Dosierung erreicht, wenngleich die Sekretion nicht dem physiologischen Ausmaß entspricht (Santerre et al. 1981; Ashcroft et al. 1986; Lambert und Atkins 1989). Auch eine physiologische Auswirkung negativer Effektoren konnte nachgewiesen werden, so verhindern das synthetische Glukokortikoid Dexamethason, Somatostatin und Adrenalin die Insulin-Freisetzung aus den Granula (Santerre et al. 1981; Ashcroft et al. 1986).

Während des Glukosemetabolismus in der Betazelle entsteht ATP (vgl. Kap. 1.1.2, S. 2), aus dem unter der Einwirkung von hormonellen Faktoren wie GLP-1 durch Aktivierung der Adenylatzyklase cAMP gebildet wird (Rassow et al. 2006). Die Schließung ATP-abhängiger K^+ -Kanäle führt über eine Membrandepolarisation zu einem Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige L-Typ-Calcium-Kanäle (vgl. Kap. 1.1.2). Dieser Mechanismus der Insulin-Freisetzung kann in den HIT-T15-Zellen durch Behandlung der Zellen mit KCl, Forskolin und durch einen Phosphodiesterase-Hemmstoff imitiert werden (Santerre et al. 1981; Ashcroft et al. 1986; Thomas und Pek 1992; Oetjen et al. 1994, 2003 und 2006; Schwaninger et al. 1995a und 1995b). Die Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration von 5mM auf 45mM hat eine Membrandepolarisation mit Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge (Thomas und Pek 1992). Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase, so dass vermehrt cAMP synthetisiert wird (Seamon und Daly 1981; Seamon et al. 1981). Die Hemmung der Phosphodiesterase verhindert den durch dieses Enzym katalysierten Abbau von cAMP (Rassow et al. 2006). Eine Insulin-Freisetzung aus den HIT-T15-Zellen konnte ebenfalls durch die in der Behandlung des Diabetes mellitus eingesetzten Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid ausgelöst werden (Ashcroft et al. 1986; Hammonds et al. 1990). Die Sulfonylharnstoff-Derivate erleichtern die Insulin-Freisetzung aus Betazellen, indem sie die Leitfähigkeit der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle vermindern, so dass das Membranpotential der Zellen sinkt und die Insulin-Freisetzung erleichtert wird (Lüllmann et al. 2006). Des Weiteren konnten Keahey et al. (1989) die Expression von spannungsabhängigen Dihydropyridin-sensitiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen nachweisen, wodurch die HIT-T15-Zellen elektrisch erregbar sind; nach Membrandepolarisation kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom mit Anstieg der intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Keahey et al. 1989). Dieses Eingreifen an unterschiedlichen Eckpunkten der Signaltransduktion zeigt, dass die Responsivität der HIT-T15-Zellen nicht allein auf den Glukose-Metabolismus beschränkt bleibt, sondern der bedeutende zweite Botenstoff cAMP in

Analogie zum Ursprungsgewebe für viele zelluläre Signaltransduktionsmechanismen wie z.B. die CRE/CREB-vermittelte Gentranskription essentiell ist (Santerre et al. 1981; Oetjen et al. 1994, 2003 und 2006). Auch bei der Regulation der Apoptose konnte eine Analogie der Tumorzelllinie zu humanen pankreatischen Betazellen gezeigt werden: Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β führen im Pankreas zu einem Verlust der Betazell-Funktion und -Masse (Rabinovitch et al. 1990; Maedler et al. 2002; Donath et al. 2003). Diese durch die Zytokine induzierte Apoptose ist auch in den HIT-T15-Zellen zeit- und konzentrations-abhängig auszulösen (Börchers et al. 2008; Klimpel et al. 2009). Des Weiteren konnten auf der Oberfläche der HIT-T15-Zellen bereits IL-1 β -Rezeptoren nachgewiesen werden (Hammonds et al. 1990). In Zusammenschau des physiologischen Verhaltens der HIT-T15-Zellen, sind sie ein geeignetes Modell, um die Mechanismen, die zur Pathogenese des Diabetes mellitus führen, zu untersuchen. Bei Betrachtung und Evaluation der Ergebnisse sollte die Abweichung einer Zellkultur vom Ursprungsgewebe jedoch berücksichtigt werden.

Das RPMI-Komplett-Medium, in dem die HIT-T15-Zellen kultiviert wurden, enthält 11,1mmol/l Glukose. Dieser Wert übersteigt den im Nüchternzustand vorliegenden Wert von etwa 4mmol/l, somit lag eine supraphysiologische Glukosekonzentration vor (Stumvoll et al. 2005). Um mögliche zellschädigende Veränderungen durch eine Glukosetoxizität zu vermeiden und um funktionellen Veränderungen der HIT-T15-Zellen wie der mit zunehmender Passagezeit verminderten Insulin-Sekretion entgegenzuwirken, wurden nur Zellen früherer Passagezeiten (ca. 30-70) verwendet (Santerre et al. 1981; Gleason et al. 2000; Stumvoll et al. 2005).

4.2 Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF α auf die DLK und die ihr untergeordnete MAPK JNK

Bei Adipositas kommt es zu einer vermehrten Sekretion von TNF α aus dem Fettgewebe, wobei die erhöhten Plasmaspiegel mit einer zunehmenden Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden und so zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen (Hotamisligil et al. 1993 und 1995; Uysal et al. 1997; Plomgaard et al. 2007). Die über den TNF-R1 vermittelte Signaltransduktion führt nachweislich auch über verschiedene Mechanismen zu einem Zelluntergang durch Apoptose (Rath und Aggarwal 1999; Varfolomeev und Ashkenazi 2004; Börchers et al. 2008). Zu diesen Mechanismen zählt die Aktivierung der MAPK-

Signalkaskade mit den stressaktivierten Proteinkinasen JNK und p38 als letzter Instanz (Sluss et al. 1994; Wajant et al. 2003). Eine der der JNK übergeordneten MAP3K ist die DLK (Gallo und Johnson 2002), wobei eine Beteiligung der DLK mit Aktivierung ihrer katalytischen Funktion in der TNF α -induzierten Signaltransduktion bisher noch nicht nachgewiesen wurde. In den Kinase-Assays mit immunpräzipitierter DLK konnte der Nachweis einer signifikanten Zunahme der enzymatischen Aktivität der Proteinkinase nach einer 60-minütigen Behandlung der HIT-T15-Zellen mit TNF α erbracht werden. Als Positivkontrolle wurde in diesen Versuchen Cyclosporin A eingesetzt, das durch selektive Inhibition der Proteinphosphatase Calcineurin zu einer Aktivierung der DLK führt (Oetjen et al. 2006; Plaumann et al. 2008). Bei Reduktion der zellulären DLK durch siRNA zeigte sich eine verminderte Aktivierung der untergeordneten MAPK JNK gemessen am Phosphorylierungsgrad, dabei war sowohl die basale JNK-Phosphorylierung vermindert als auch die Zunahme der JNK-Aktivierung unter der Behandlung mit TNF α . Obgleich die TNF α -induzierte JNK-Phosphorylierung durch die Reduktion der DLK nicht aufgehoben wurde, ist eine Beteiligung der DLK an dem durch TNF α -aktivierten JNK-Signalweg damit sehr wahrscheinlich.

Die Verwendung von siRNA zur Degradation der Ziel-mRNA zeichnet sich im Gegensatz zum Einsatz von MLK-Inhibitoren wie CEP-1347 (Maroney et al. 2001; Roux et al. 2002) durch eine sehr hohe Spezifität in Bezug auf das auszuschaltende Protein aus (Semizarov et al. 2003). Allerdings kommt es durch den Einsatz der siRNA nicht zu einem vollständigen Ausschalten des Zielproteins; in den vorliegenden Versuchen konnte durch die Transfektion - ausgehend von den mit unspezifischer RNAi transfizierten, unbehandelten Zellen - eine Reduktion der DLK auf $35 \pm 8\%$ in der mit TNF α behandelten Gruppe und auf $46 \pm 14\%$ in der unbehandelten Gruppe erreicht werden, wobei eine stärkere Auswirkung auf die Signalmechanismen der Zellen bei völligem Ausschalten des Genprodukts nicht auszuschließen ist. Bei Betrachtung der Ergebnisse von Untersuchungen der MLK3, ist es aber unklar inwiefern der Mechanismus einen 100%ig physiologischen Effekt widerspiegelt: In einem Vergleich waren einige Ergebnisse die durch Einsatz von siRNA gegen die MLK3 erlangt wurden (Swenson et al. 2003; Chadee und Kyriakis 2004), in Versuchen mit Fibroblasten aus MLK3-Knock-out-Mäusen (MLK3^{-/-}) nicht zu reproduzieren (Brancho et al. 2005).

Die Untersuchungen zur TNF α -induzierten Apoptose anhand des antiapoptotisch wirkenden Bcl-xL konnten keine weiteren Erkenntnisse zur Rolle der DLK in der Signaltransduktion

bringen: Durch TNF α kam es zu einer Abnahme der Bcl-xL-Proteinmenge im Einklang mit der Apoptose-induzierenden Wirkung dieses Zytokins. Durch den Einsatz der siRNA zur Reduktion der zellulären DLK kam es zwar zu einer Verminderung des Effektes von TNF α auf den Bcl-xL-Proteingehalt, es wurden jedoch insgesamt die basalen Level an Bcl-xL gesenkt, was eher gegen eine wesentliche Beteiligung der DLK an der Signaltransduktion spricht. Allerdings ist der Effekt von TNF α auf den Proteingehalt des Bcl-xL sehr gering ausgeprägt, und zusätzlich kam es zu einer gleichzeitigen Veränderung der DLK-Proteinmenge unter der Einwirkung von TNF α , wodurch die Ergebnisse eine verminderte Aussagekraft haben. Da bereits in Immunfluoreszenz-Versuchen mit einem Antikörper gegen Caspase-3 eine Beteiligung der DLK in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion an dem TNF α -induzierten Betazell-Untergang nachgewiesen werden konnte (Börchers et al. 2008), könnte der Einsatz eines anderen Apoptose-Indikators mehr Einsichten bringen.

Um einen weiteren Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität der DLK und dem JNK-Signalweg zu evaluieren, wurden in-vitro-Kinase-Assay nach 60-minütiger Behandlung mit TNF α unter Hemmung der JNK mit dem Inhibitor SP600125 durchgeführt. Dabei beruht die Überlegung für diese Untersuchung auf der Annahme, dass zwischen der JNK und der DLK eine positive Feedback-Schleife besteht, bei der durch Apoptose fördernde Stimuli die endogenen aktivierten Komponenten des JNK-Signalweges stabilisiert werden und zu einem Level kumulieren, das ausreicht, den Zelltod auszulösen (Xu et al. 2005; Schachter et al. 2006). Bei dieser engen funktionellen Assoziation der Komponenten würde eine aktivierende JNK-induzierte Phosphorylierung der übergeordneten MAP3K durch JNK-Inhibition aufgehoben werden. Diese Assoziation bestätigte sich, denn unter Einwirkung des JNK-Inhibitors blieb die TNF α -induzierte Zunahme der enzymatischen Aktivität der DLK aus. Damit konnte zum ersten Mal mit endogenen Proteinen eine positive Feedback-Schleife im MAPK-Signalweg nachgewiesen werden, deren Bestehen zuvor bei Überexpression der Komponenten vermutet wurde (Nihalani et al. 2001). Zwar wird die Spezifität von SP600125 in Bezug auf die alleinige Inhibition der JNK angezweifelt (u. a. soll auch die p38 von der Hemmung betroffen sein; Bain et al. 2003), der Einsatz des JNK-Inhibitors ergab jedoch konsistente Ergebnisse im Vergleich mit Daten basierend auf JNK-Knock-out-Mäusen (Bennett et al. 2001). Diese amplifizierende Assoziation der Komponenten des MAPK-Signalweges wurde zunächst an der MAP3K MLK3 verbunden mit der Behandlung von HeLa-Zellen mit DNA-schädigendem Camptothecin, das zur Apoptose über den JNK-Signalweg führt, beschrieben (Xu et al. 2005). Der Apoptose-induzierende Stimulus wurde in

diesem Versuch allerdings über einen Zeitraum von bis zu 6h gesetzt und war in der Lage, den MLK3-Gehalt der Zellen innerhalb dieser Zeit stabilzuhalten; dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zum Verhalten der DLK unter längerem Einwirken Apoptose-induzierender Stimuli, denn während der Auswertung dieser Versuche war eher eine Abnahme der DLK-Proteinmenge aufgefallen. Im Zusammenhang könnte das bedeuten, dass die DLK sowohl für die basale als auch für die TNF α -induzierte Aktivierung der JNK eine wesentliche Rolle spielt, aber zumindest an der Vermittlung der TNF α -induzierten Signale auf die JNK noch weitere Mediatoren beteiligt sind. Das stellt die Relevanz der Apoptose-induzierenden Funktion der DLK jedoch nicht in Frage, da sie nachweislich in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion zum Zelluntergang in Betazellen (Plaumann et al. 2008; Borchers et al. 2008), Fibroblasten (Robitaille et al. 2008) und neuronalen Zellen (Xu et al. 2001; Chen et al. 2008) führen kann. Vielmehr lenkt es die Überlegung zu weiteren Gesichtspunkten, bei denen der Transkriptionsfaktor CREB in den Mittelpunkt der Betrachtung rückt: CREB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, dessen transkriptionelle Aktivität durch Phosphorylierung an Ser-133 (bzw. Ser-119) von einer Vielzahl von Stimuli und induzierenden Kinasen reguliert wird. Infolge einer Phosphorylierung rekrutiert CREB den Co-Aktivator CREB-binding protein (CBP) und bindet an Gene, welche durch das cAMP-responsive element (CRE) mit der oktameren Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3' reguliert werden (Sheng et al. 1990; Mayr und Montminy 2001). In der pankreatischen Betazelle ist CREB essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion, da es an das Insulingen bindet und es aktiviert (Oetjen et al. 1994 und 2003), die Betazellapoptose verhindert und das Überleben der Betazellen u. a. durch Induktion von IRS 2 fördert (Withers et al. 1998; Jhala et al. 2003). Zahlreiche Untersuchungen wiesen die regulatorische Rolle der DLK in Bezug auf CREB nach, so wird sowohl die durch Membrandepolarisation als auch die durch die cAMP-sensitive Proteinkinase A (PKA) induzierte transkriptionelle Aktivität von CREB durch die DLK inhibiert (Reddy et al. 1999; Oetjen et al. 2006). Zusätzlich gibt es Belege dafür, dass auch die durch TNF α verursachte Inhibition der durch Membrandepolarisation induzierten transkriptionellen Aktivität von CREB durch die DLK beeinflusst wird (Borchers et al. 2008). Diese Beteiligung an der Signaltransduktion könnte auch Hinweise darauf geben, wie es durch TNF α zu einer Inhibition der Insulin-Sekretion kommen kann (Zhang S und Kim 1995). Neben einer direkten Interaktion der DLK mit Substraten im Kern (Wallbach 2010) stützen Veröffentlichungen in anderen Zellsystemen die Rolle der DLK in der Aktivierung weiterer MAPK-Signalwege wie p38, ERK (umstritten) und Akt (Fan et al. 1996; Nakata et

al. 2005; Daviau et al. 2009). Damit kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderer Effektor als JNK zusätzlich die TNF α -induzierten DLK-Signale vermittelt. Die Ursachen für die auch unter Reduktion der DLK zunehmende TNF α -induzierte JNK-Phosphorylierung sind wahrscheinlich in einer weiteren MAP3K zu suchen. Dabei sind zahlreiche MAP3K bekannt, die nachweislich an der TNF α -induzierten JNK-Aktivierung beteiligt sind, darunter die MEKK1 (Xia et al. 2000), die Mixed lineage kinase 3 (MLK3; Sathyanarayana et al. 2002; Brancho et al. 2005), die Transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1; Sato et al. 2005; Shim et al. 2005), Tumor progression locus 2 (Tpl2; Das et al. 2005) und die Apoptosis signal-regulating kinase (ASK1/2; Ichijo et al. 1997).

Während der Auswertung der Versuche fiel bei längeren Inkubationszeiten mit TNF α wiederholt eine Abnahme der DLK-Proteinmenge in den HIT-T15-Zellen auf, was zu der Veranlassung führte, diesen Sachverhalt näher zu untersuchen. Die zeitabhängige Quantifizierung ergab eine Reduktion um etwa 30%, die nach einer 6-stündigen Behandlung mit TNF α auftrat und nach 12h und 24h etwa auf demselben Level blieb. Da die DLK, wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, mit einer Halbwertszeit von 2h und 26min \pm 24min einem relativ schnellen Erneuerungszyklus unterliegt, stellt sich die Frage, ob die TNF α -induzierte Reduktion der DLK-Proteinmenge einer Degradation des Proteins auf dem Ubiquitin-Proteasom-Pfad, auf dem die Mehrheit der intrazellulären Proteine abgebaut werden, unterliegt oder ob die Reduktion auf einer Inhibition der Proteinbiosynthese der DLK beruht. Um zu untersuchen, ob der TNF α -induzierten Reduktion der DLK-Proteinmenge eine verstärkte Degradation zugrunde liegt, wurden die Proteasom-Inhibitoren Lactacystin und Epoxomicin eingesetzt, die die 20S-Komponente des Proteasoms hemmen (Dick et al. 1996; Meng et al. 1999). Durch die Hemmung des Proteasoms mit Lactacystin kam es in der Kontrolle zu einem Anstieg der DLK-Proteinmenge auf 136 \pm 12%, und der reduzierende Effekt einer 12-stündigen Behandlung mit TNF α auf die DLK wurde vermindert. Unter Epoxomicin kam es, abgesehen von der durch den Wirkstoff ausgelösten Reduktion der DLK, zu einer ähnlichen Tendenz. Dieses Ergebnis gibt Hinweise darauf, dass es zu einer Zunahme der proteasomalen Degradation der DLK durch die Einwirkung von TNF α kommt. Orientierend wurde daraufhin eine Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid durchgeführt (Obrig und Gottlieb 1970), dabei war keine Reduktion der DLK durch TNF α zu verzeichnen. Da allerdings die Wirkung des Cycloheximids als Kontrollbedingung selbst schon zu einer sehr starken Reduktion der DLK auf 44 \pm 9% führt, kann keine definitive Aussage in diesem Bereich getroffen werden, denn der zusätzliche Effekt der Behandlung mit

TNF α auf die DLK-Proteinmenge könnte ausgeblieben sein. Damit ist nicht auszuschließen, dass auch eine Hemmung der Proteinbiosynthese Anteil an der TNF α -induzierten Reduktion der DLK in den HIT-T15-Zellen hat. Zahlreiche publizierte Daten weisen jedoch auf eine posttranslationale Modifikation der DLK durch Ubiquitinierung und proteasomale Degradation hin; dabei wird die Ubiquitinierung zum einen durch die E3-Ubiquitin-Ligase PHR (Pam-Highwire-RPM-1) katalysiert (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Lewcock et al. 2007; Abrams et al. 2008; Park et al. 2009), zum anderen ist aber auch die Katalyse durch die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP als Co-Chaperon vom Hitzeschockprotein 70 (HSP70) beschrieben worden (Daviau et al. 2006). Gemeinsam ist den erhobenen Daten, dass es nur in Abhängigkeit von der Aktivierbarkeit der katalytischen Funktion der DLK bzw. durch deren Überexpression, die zur Autophosphorylierung der MLKs führen kann (Xu et al. 2003), in den Zellen zu einem Abbau der Proteinkinase kam. Um in diesem Sinne einen weiteren Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität der DLK und ihrer Reduktion zu evaluieren, wurden in den HIT-T15-Zellen durch transiente Transfektionen der DLK wt und die beiden Kinase-toten Mutanten DLK K185A und DLK S302A überexprimiert. Unter der Expression des DLK wt kam es, wie bei der endogenen DLK, zu einer TNF α -induzierten Reduktion der DLK-Proteinmenge, während sie bei den mit den Kinase-toten Mutanten transfizierten Zellen ausblieb. Somit zeigen sich vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf eine proteasomale Degradation der DLK in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion.

Für diese scheinbar im Gegensatz stehenden Mechanismen (zum einen eine durch Apoptose-induzierende Signale ausgelöste Feedback-Schleife zur Signalamplifikation und Stabilisation der MAPK-Komponenten und zum anderen eine durch dieselben Signale induzierte Aktivierung mit darauffolgender proteasomaler Degradation der MAP3K) fällt eine Erklärung schwer. Eine mögliche Antwort könnte in der unterschiedlichen Signalübermittlung zu finden sein: Es gibt Belege dafür, dass der frühen Phase (<1h) der TNF α -induzierten JNK-Aktivierung in der späten Phase (max. zw. 4-8h) eine Aufrechterhaltung dieses Status unabhängig von der Signalübermittlung über TRAF2 durch eine TNF α -induzierte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) folgt (Sakon et al. 2003). Während die Untersuchungen bezüglich der Aktivierung der enzymatischen Aktivität der DLK nur innerhalb des Zeitraums von einer Stunde erfolgten, war eine signifikante Abnahme der DLK-Proteinmenge erst nach sechs Stunden zu detektieren. Eine mögliche Beteiligung der ROS, die nachweislich - allerdings unabhängig von der katalytischen Funktion - zu einer Reduktion der DLK-Proteinmenge führen (Kutschenko 2007), ist somit nicht auszuschließen.

4.3 Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β auf die DLK und die ihr untergeordnete MAPK JNK

Adipositas führt, neben der zumeist bestehenden Hyperglykämie, auch über die vermehrte Bildung von Leptin und der durch diese beiden Faktoren vermittelten Sekretion von IL-1 β durch die pankreatischen Betazellen zu einer Dysbalance von IL-1 β und IL-1Ra (Maedler et al. 2002 und 2004). Bei kurzer Inkubation (45, 90min) von Betazellen führt IL-1 β zu einer Zunahme der Insulin-Sekretion, in niedrigen Konzentrationen sogar zur Betazell-Proliferation; eine länger andauernde Inkubation (48h) führt jedoch zur Betazell-Dysfunktion und Apoptose (Spinas et al. 1988; Hammonds et al. 1990; Maedler et al. 2002 und 2006). Die IL-1 β -induzierte Signaltransduktion führt zur Aktivierung der MAPKs ERK-1/2, JNK und p38, wobei JNK dabei die tragende Apoptose-induzierende Rolle zu spielen scheint, da eine Inhibition von ERK-1/2 und p38 eine IL-1 β -induzierte Apoptose nur teilweise verhindern kann (Pavlovic et al. 2000; Saldeen et al. 2001), während die Inhibition von JNK den Prozess tiefgreifend beeinflusst (Ammendrup et al. 2000; Bonny et al. 2001; Major und Wolf 2001). Da die DLK der JNK übergeordnet ist (Gallo und Johnson 2002) und eine Beteiligung dieser MAP3K an Apoptose-induzierenden Prozessen mehrfach nachgewiesen wurde (Xu et al. 2001; Chen et al. 2008; Plaumann et al. 2008; Robitaille et al. 2008), sollte in Analogie zu den Versuchen mit TNF α die Auswirkung von IL-1 β auf die enzymatische Aktivität der DLK untersucht werden. In den Kinase-Assays mit immunpräzipitierter DLK war zwar eine leichte Steigerung der enzymatischen Aktivität der Proteinkinase zu detektieren, eine signifikante Zunahme konnte jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachgewiesen werden. Um einen fehlenden Effekt von IL-1 β auf die MAPK-Signalkaskade in den HIT-T15-Zellen auszuschließen, wurde im Anschluss die Aktivierung der JNK anhand des Phosphorylierungsgrades gemessen. Unter der Einwirkung von IL-1 β kam es zu einer signifikanten Zunahme der JNK-Phosphorylierung zu jedem der gewählten Zeitpunkte, mit maximaler Steigerung auf $308 \pm 36\%$ nach 30-minütiger Behandlung. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die IL-1 β -induzierte JNK-Phosphorylierung in den HIT-T15-Zellen unabhängig von der DLK verläuft und durch eine weitere MAP3K vermittelt zu werden scheint. Dabei sind wie für TNF α auch für IL-1 β MAP3Ks bekannt, die nachweislich an der JNK-Aktivierung beteiligt sind, darunter die MEKK1 (Xia et al. 2000) und die TAK1 (Sato et al. 2005; Shim et al. 2005).

Da auch in den Versuchen mit IL-1 β wiederholt eine Abnahme der DLK-Proteinmenge bei längerem Einwirken von IL-1 β in den HIT-T15-Zellen auffiel, sollte diese Reduktion zur Untersuchung der Signifikanz quantifiziert werden. Die durch IL-1 β induzierte Reduktion der DLK war dabei wesentlich stärker ausgeprägt, als die durch TNF α . Schon nach 30-minütiger Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der DLK-Proteinmenge auf $78 \pm 3\%$, die weiterhin konsequent abfiel und nach 24h bei $30 \pm 3\%$ lag. Zur Differenzierung einer möglichen IL-1 β -induzierten Inhibition der Proteinbiosynthese von einer möglichen Hemmung der proteasomalen Degradation wurden die jeweiligen Mechanismen in Analogie zu den Versuchen mit TNF α gehemmt. Ausgehend von der durch Lactacystin gehemmten proteasomalen Degradation mit einer Steigerung der DLK-Proteinmenge auf $136 \pm 12\%$, sank die DLK immer noch signifikant auf Werte von $87 \pm 14\%$ bei einer 12-stündigen Behandlung mit IL-1 β . Unter Epoxomicin kam es, abgesehen von der durch den Wirkstoff ausgelösten Reduktion der DLK, zu einer ähnlichen Tendenz, jedoch ohne Signifikanz. Orientierend wurde daraufhin eine Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid durchgeführt (Obrig und Gottlieb 1970), dabei war keine Reduktion der DLK durch IL-1 β zu verzeichnen. Da allerdings die Wirkung des Cycloheximids als Kontrollbedingung selbst schon zu einer sehr starken Reduktion der DLK auf $44 \pm 9\%$ führt, kann keine definitive Aussage in diesem Bereich getroffen werden, denn der zusätzliche Effekt der Behandlung mit IL-1 β auf die DLK-Proteinmenge könnte ausgeblieben sein. Die publizierten Daten zur Degradation der DLK (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Daviau et al. 2006; Lewcock et al. 2007; Abrams et al. 2008; Park et al. 2009) und auch die eigenen Daten zur TNF α -induzierten Reduktion der DLK (s. Kap. 4.2) weisen eher auf eine proteasomale Degradation der DLK hin, ein Anteil der Hemmung der Proteinbiosynthese an der IL-1 β -induzierten Reduktion der DLK in den HIT-T15-Zellen ist aber nicht auszuschließen. Da IL-1 β einen deutlich stärkeren Effekt als TNF α auf die Proteinmenge der DLK in den Versuchen gezeigt hat, wäre es möglich, dass die Hemmung des Proteasoms durch Lactacystin und Epoxomicin, die als Inhibitoren nicht zu einem vollständigen Verlust der Funktion des Proteasoms führen, nicht ausreicht, um die Auswirkungen von IL-1 β auf die DLK signifikant zu schwächen. Konsistent mit einer eher gesteigerten proteasomalen Degradation durch Einwirken von IL-1 β gestalteten sich die Ergebnisse bei der Untersuchung der Degradation in Abhängigkeit von der katalytischen Funktion der DLK durch transiente Transfektionen des DLKwt und der beiden Kinase-toten Mutanten DLK K185A und DLK S302A. Unter der Expression des DLKwt kam es wie bei der endogenen DLK zu einer IL-1 β -induzierten Reduktion der DLK-Proteinmenge,

während sie bei den mit den Kinase-toten Mutanten transfizierten Zellen ausblieb. Somit zeigen sich auch unter der Behandlung mit IL-1 β vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf eine proteasomale Degradation der DLK in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion (Daviau et al. 2006; Abrams et al. 2008).

Es ist unklar, weshalb es durch die Behandlung der HIT-T15-Zellen mit IL-1 β , trotz der nicht signifikanten Aktivierung der katalytischen Funktion verglichen mit TNF α , zu einer Degradation der DLK kommt. Eine gleichzeitige Degradation, die eine durch IL-1 β induzierte Aktivierung - eine leichte Steigerung der enzymatischen Aktivität der DLK war zu detektieren - ausschaltet, scheint physiologisch nicht sinnvoll. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die IL-1 β -induzierte Signaltransduktion durch eine Interaktion mit dem Gerüstprotein JIP-1 mit dem DLK-Signalweg interferiert. Als eine Funktion des Gerüstproteins wurde seine Eigenschaft als Träger des Motorproteins Kinesin-1 gezeigt (Bowman et al. 2000; Verhey et al. 2001; Whitmarsh et al. 2001), das am Plus-Ende der Mikrotubuli lokalisiert ist (Karcher et al. 2002) und möglicherweise die subzelluläre Lokalisation der MAPKs kontrolliert (Handley et al. 2007). Für diese Funktion von JIP-1 in Assoziation mit Kinesin-1 spricht, dass auch die DLK entlang der Längsseite der Mikrotubuli und konzentriert an deren Enden in Richtung der Zellperipherie lokalisiert vorliegt (Hirai et al. 2002). Infolge der Assoziation mit dem Motorprotein könnten die Komponenten des MAPK-Signalweges zwischen dem Ort der Aktivierung in der Nähe der Zellmembran und dem Kern zur Phosphorylierung der Substrate transportiert werden. In sich entwickelnden Neuronen konnte bereits eine Akkumulation von JIP-Proteinen in den Wachstumszentren durch die Interaktion mit den Motorproteinen gezeigt werden (Verhey et al. 2001; Whitmarsh et al. 2001). Es gibt Belege dafür, dass IL-1 β allein und in Kombination mit anderen Zytokinen (abhängig vom Zelltyp) zu einer Reduktion von JIP-1 führen kann (Bonny et al. 2000; Haefliger et al. 2003; Ling et al. 2003). Es wäre möglich, dass die DLK, die durch JIP-1 in ihrem monomeren, unphosphorylierten und katalytisch inaktiven Zustand gehalten wird (Nihalani et al. 2001), bei Verminderung dieses Gerüstproteins ihren Zielort zum Teil nicht erreicht. Durch das ungebundene Vorliegen käme es gleichzeitig zu einer Dimerisierung und Aktivierung der Proteinkinase, die aber ohne Auswirkung bleibt, weil die Nähe zu den Substraten nicht gegeben ist. Somit wäre eine proteasomale Degradation der katalytisch aktivierbaren Proteinkinase möglich. Des Weiteren ist denkbar, dass der Anteil der DLK, der dennoch in den Kern gelangt (Wallbach 2010), nicht ausreicht, um einen Effekt auszulösen. Die JNK könnte indes durch zahlreiche andere MAP3K aktiviert (s. o.) zu einem Zelluntergang durch Apoptose führen. Schließlich ist auch

an die Möglichkeit zu denken, dass es durch die Zytokine zu einer Kompartimentalisierung des JNK-Signals kommt, wobei sich diese für TNF α und IL-1 β unterscheidet.

4.4 Bedeutung der Auswirkung der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die DLK und den MAPK-Signalweg für die Pathogenese des Diabetes mellitus im Vergleich

Proinflammation ist ein Zustand, der entweder, z.B. in Form eines adäquaten Verteidigungsmechanismus, günstige Auswirkungen haben kann, oder, vor allem wenn die Proinflammation länger andauert, einen schädlichen Einfluss ausübt (Esch und Stefano 2002). Auf Basis der zahlreichen überschneidenden Funktionen und dem ähnlichen Produktionsmuster werden TNF α und IL-1 β in der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine zusammengefasst (Dinarello 2007). Auch wenn die beiden Moleküle keinerlei Sequenzhomologie aufweisen (Warren 1990), spielen in den induzierten Signalwegen eine funktionelle Redundanz sowie eine erhebliche Pleiotropie eine große Rolle (Taniguchi 1995), d. h. bestimmte biologische Funktionen werden häufig durch mehr als ein Zytokin vermittelt, jedes einzelne Zytokin kann aber auch vielseitige Funktionen übernehmen, u. a. in Abhängigkeit vom Gewebe. Die Auswirkung einer Kombination der beiden Zytokine geht häufig über einen additiven Effekt hinaus; so werden z.B. die zytotoxischen Effekte von IL-1 β auf die pankreatischen Betazellen durch TNF α drastisch gesteigert (Mandrup-Poulsen et al. 1987; Dinarello 1991). Die intrazelluläre Signaltransduktion von TNF α und IL-1 β unterscheidet sich in den aktivierten Signalkomplexen, konvergiert jedoch bei NF κ B und den MAPK (vgl. Kap. 1.2, S. 7). Das Gleichgewicht von NF κ B und JNK ist dabei entscheidend, denn NF κ B, dessen Zielgene Caspase-Inhibitoren beinhalten, begünstigt eher das Überleben der Zelle, während die JNK-Aktivierung über den Transkriptionsfaktor c-Jun/AP-1 die Apoptose fördert (Tang et al. 2001; Chang L et al. 2006). Allerdings gibt es Belege dafür, dass beide Signalwege sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen einnehmen können (Giannoukakis et al. 2000; Chang I et al. 2003; Lamb et al. 2003; Ventura et al. 2006). Die Beteiligung einer großen Gruppe von MAP3K an dem JNK-Signalweg ist bekannt, jedoch nicht, welche MAP3Ks für spezielle physiologische Stimuli maßgeblich sind (Davis 2000). In den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit gibt es einen klar abzugrenzenden Effekt der Zytokine TNF α und IL-1 β in Bezug auf die Aktivierung der MAP3K DLK. Während die 60-minütige Behandlung mit TNF α zu einer signifikanten Steigerung der enzymatischen

Aktivität der DLK führt, kam es zu keinem der Zeitpunkte der Behandlung mit IL-1 β zu einer signifikanten Aktivierung der Proteinkinase. Da die Versuche mit endogener DLK durchgeführt wurden, ist zumindest die Annahme eines Artefaktes durch Überexpression der Proteinkinase, die zu spontaner Autophosphorylierung führen kann (Nihalani et al. 2000), ausgeschlossen. TNF α und IL-1 β führen jeweils zu einer deutlichen JNK-Phosphorylierung in den HIT-T15-Zellen, an der die DLK bei Behandlung der Zellen mit TNF α beteiligt ist. Bei dieser TNF α -induzierten JNK-Aktivierung reiht sich die DLK in den Kreis der bereits untersuchten MAP3Ks ein; eine unentbehrliche Rolle im JNK-Signalweg ist für keine Einzelne - MLK3 (Brancho et al. 2005), MEKK1 (Yujiri et al. 2000), ASK1 (Tobiume et al. 2001) - nachzuweisen, und auch für die DLK gelingt dies nicht. Während der embryonalen Entwicklung kommt es auch in Abwesenheit von c-Jun zur Apoptose, somit ist das Gen nicht unumgänglich für die Induktion des Zelluntergangs (Roffler-Tarlov et al. 1996). Damit könnte neben der Regulation der MAPK-Signalkaskade der inhibitorische Effekt der DLK auf den Transkriptionsfaktor CREB, der nachweislich für die Aufrechterhaltung der Funktion und das Überleben der Betazellen verantwortlich ist (Jhala et al. 2003), zusätzlich in den Mittelpunkt rücken. Im Vergleich der MAP3Ks weist die MLK3 als Mitglied der MLKs besonders große Ähnlichkeiten mit der DLK auf: Neben der für die Aktivierung ebenso notwendigen Dimerisation über Leucine-Zipper (Leung und Lassam 1998), führt TNF α - wie bei Verminderung der DLK durch siRNA - in Fibroblasten von MLK3-Knock-out-Mäusen (MLK3^{-/-}) zu einer verminderten JNK-Aktivierung, während ein Effekt auf die IL-1 β -induzierte JNK-Aktivierung durch die Ausschaltung der MLK3 ausbleibt (Brancho et al. 2005). Auch der Mechanismus der amplifizierenden Aktivierung der DLK durch die untergeordnete MAPK JNK wurde als Erstes an der MLK3 festgestellt (Xu et al. 2005; Schachter et al. 2006). Während die MLK3 jedoch ubiquitär exprimiert wird (Brancho et al. 2005), ist die Expression der DLK limitiert auf wenige Gewebe (Nervensystem, Leber, Pankreas, Niere, Hoden, Haut, vgl. Kap. 1.4, S. 13) und damit selektiver in den Prozess der Auswirkung von TNF α auf die pankreatischen Betazellen involviert. In dopaminergen Neuronen, zum Beispiel, kann die Neurotoxin-induzierte Apoptose, die durch Phosphorylierung von c-Jun vermittelt wird, nur durch Kinase-tote Formen der DLK (DLK K152A, DLK-LZ), nicht jedoch durch eine Kinase-tote Form der MLK3 (MLK3 K144R) verhindert werden (Chen et al. 2008). Die grundlegende Bedeutung der DLK für biologische Prozesse zeigt sich in homozygoten Knock-out-Mäusen (DLK^{-/-}), die perinatal sterben (Hirai et al. 2006), während homozygote MLK3-Knock-out-Mäuse (MLK3^{-/-}) lebensfähig sind und

lediglich einen epidermalen Defekt entlang der dorsalen Mittellinie aufweisen (Brancho et al. 2005).

Inwiefern die Zytokin-induzierte Degradation der DLK für die Regulationsmechanismen der Betazelle eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht bekannt. Die proteasomale Degradation von Proteinen ist die Grundlage für viele zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellzyklus, Differenzierung, Genexpression und Signaltransduktion (Naujokat und Hoffmann 2002). Auch in der Regulation der Apoptose spielt die proteasomale Degradation durch Modulation der Menge an Proteinen mit pro- und antiapoptotischen Eigenschaften eine zentrale Rolle (Jesenberger und Jentsch 2002). Die erhobenen Daten zur Reduktion der DLK zeigen, dass endogene und exogene DLK in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion Zytokin-induziert proteasomal degradiert wird. Gemessen an der proapoptotischen Rolle der DLK könnte die Reduktion einen Schutzmechanismus der Betazellen implizieren. Konsistent mit dieser Vorstellung zeigen publizierte Daten, dass die Überexpression oder Aktivierung von endogener DLK in Fibroblasten in Abhängigkeit von der katalytischen Funktion zu ihrer proteasomalen Degradation führen, die durch das Hitzeschockprotein HSP70 gefördert wird (Daviau et al. 2006). HSPs sind Chaperon-Proteine, die durch umgebungsbedingten, physikalischen und chemischen „Stress“ induziert werden und die durch Schädigung entstehenden Konsequenzen limitieren und das Zell-Überleben ermöglichen (Beere 2004). HSP70 entfaltet seine Wirkung zusammen mit dem Co-Chaperon CHIP, einer E3-Ubiquitin-Ligase, die die Ubiquitinierung und die anschließende Degradation der HSP70-Substrate vermittelt (McDonough und Patterson 2003). HSP70 stellt sich somit als ein negativer Regulator der Expression und der Aktivität der DLK dar und könnte so den Schutz der Zellen gewährleisten, denn die verminderte DLK-Expression wird begleitet von einer reduzierten JNK-Phosphorylierung bei gleichbleibender JNK-Proteinmenge (Daviau et al. 2006). Untersuchungen, die an Tumorzellen durchgeführt wurden, konnten einen Bezug zu den Zytokinen herstellen, denn HSP70 schützt diese Zellen vor den zytotoxischen Effekten durch die Einwirkung von TNF α (Jaattela und Wissing 1993). In neuronalen Zellen trägt die Ubiquitinierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase PHR (Pam, Highwire, RPM-1) und die anschließende proteasomale Degradation der DLK zur Ausbildung einer korrekten Morphologie der Synapsen (Nakata et al. 2005; Collins et al. 2006; Abrams et al. 2008) sowie zum Funktionieren des axonalen Transports bei (Horiuchi et al. 2007; Lewcock et al. 2007) und ist essentiell für die Regeneration von durchtrennten Axonen (Lewcock et al. 2007; Hammarlund et al. 2009; Yan et al. 2009) bzw. deren Degeneration (Miller et al. 2009). Auch

für andere MAP3Ks, u. a. die MEKK1 ist eine Modifikation durch Ubiquitinierung bekannt, die zur Konsequenz hat, dass die katalysierte Phosphorylierung des untergeordneten MAPK-Signalweges inhibiert wird (Witowsky und Johnson 2003). Zahlreiche weitere Komponenten der Zytokin-induzierten Signaltransduktion und Bestandteile des MAPK-Signalweges unterliegen diesem Regulationsmechanismus, dabei beeinflusst die Ubiquitinierung die Wirkung und Dauer eines Signals durch die Strukturierung der Kinase-Komplexe, die subzelluläre Lokalisation und die Degradation der Proteinkinase selbst oder ihres Substrates (Laine und Ronai 2005).

Die erhöhte Apoptoserate der Betazellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Während einige Veröffentlichungen eher einen Verlust der Betazellfunktion unterstützten (Kloppel et al. 1985; Guiot et al. 2001), konnte inzwischen die Vorstellung einer erhöhten Apoptose-Rate als ein zentraler Mechanismus für das Defizit der Betazellmasse bei Patienten mit NIDDM gezeigt werden (Donath et al. 1999; Butler et al. 2003; Rhodes 2005). Dies ist auch ein entscheidender Mechanismus in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 1 (vgl. Kapitel 1.1.3, S. 3). Damit spielt die Betazell-Apoptose in beiden Typen eine zentrale Rolle, auch wenn (klinisch) Unterschiede in der Insulinabhängigkeit bestehen, nämlich in Typ 1 sehr schnell, in Typ 2 erst nach längerer Zeit. In der „Accelerator Hypothesis“ charakterisiert Wilkin (2001) diese Überlappung, wobei er überspitzt zugrunde legt, dass es sich um ein und dieselbe Erkrankung handele, die nur durch die Zeit und die damit verbundene Apoptose-Rate sowie ihrer drei Beschleuniger bestimmt wird. Diese drei beschleunigenden Faktoren sind die konstitutionell vorhandene hohe Apoptose-Rate, die Insulin-Resistenz durch Übergewicht und Bewegungsmangel und als drittes die Gruppe, die genetisch belastet mit beiden erst genannten Faktoren, eine Autoimmunerkrankung der Betazellen entwickelt. Die autoimmune Komponente könnte dabei allerdings sowohl Ursache als auch Ergebnis der Zerstörung der Betazellen sein (Wilkin 2001). Nicht nur in Bezug auf die Betazellapoptose verschwimmen die Grenzen zwischen den beiden Typen: Die Insulinresistenz, lange Zeit als Kernelement des Diabetes mellitus Typ 2 angenommen (Stumvoll et al. 2005), wird zunehmend auch mit dem Typ 1 in Verbindung gebracht (Hypponen et al. 2000; Chaparro et al. 2006). Proinflammatorische Zytokine spielen in der Pathogenese beider Typen eine Rolle und könnten dabei auf sich überschneidende oder sogar identische Signalwege zurückgreifen (Mandrup-Poulsen 2003; Donath et al. 2008). Erste Versuche diese Stimuli zu blockieren und so in die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 einzugreifen, zeigten einige Erfolge: In einer Studie mit Patienten, die sich einer 13-

wöchigen Therapie mit Blockade des Interleukins durch einen IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) unterzogen, konnten die Nüchtern-Blutzuckerwerte und der HbA_{1c}-Wert gesenkt werden, außerdem kam es zu einer Abnahme der Entzündungsmarker CRP und IL-6 und die sekretorische Funktion der Betazellen konnte verbessert werden (Larsen et al. 2007). Die Behandlung mit Infliximab, einem chimären monoklonalen Antikörper gegen TNF α (Knight et al. 1993), konnte in kleineren Studien eine Besserung der Insulinsensitivität bei Patienten mit rheumatoider Arthritis hervorrufen (Yazdani-Biuki et al. 2004; Gonzalez-Gay et al. 2006). Dieser Effekt war jedoch in einer kontrollierten Studie mit Adalimumab (Rosenvinge et al. 2007), ebenfalls ein monoklonaler TNF α -Antikörper (Lüllmann et al. 2006), sowie einer vierwöchigen Behandlung mit Etanercept (Dominguez et al. 2005), einem Fusionsprotein, das TNF-Moleküle bindet und damit biologisch inaktiviert (Mohler et al. 1993), nicht nachzuweisen. Kritisch anzumerken ist bei diesen Studien jedoch die kleine Fallzahl und kurze Anwendungsdauer der TNF α -Antagonisten. Des Weiteren konnte in klinischen Versuchen unter Behandlung mit Etanercept eine vermehrte Produktion von TNF α durch T-Zellen beobachtet werden (Zou et al. 2003), weswegen eine mögliche Störung des Ergebnisses durch einen solchen Faktor ausgeschlossen werden sollte.

4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen klar abzugrenzenden Effekt der Zytokine TNF α und IL-1 β in Bezug auf die Aktivierung der MAP3K DLK. Während bei der Behandlung der HIT-T15-Zellen mit IL-1 β keine Auswirkungen auf die Aktivität der DLK zu beobachten waren, konnte TNF α als Stimulus für die Aktivierung der enzymatischen Aktivität der DLK etabliert werden. Unter der Einwirkung von TNF α war eine eindeutige Beteiligung der DLK an dem Apoptose-induzierenden JNK-Signalweg, sowie eine durch dessen Aktivierung hervorgerufene, Signal-amplifizierende Wirkung in Form eines Feedback-Mechanismus auf die vorgeschaltete DLK nachzuweisen. Neben der Aktivierung des JNK-Signalweges ist die DLK zusätzlich über eine inhibitorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor CREB an der Zellapoptose in der pankreatischen Betazelle beteiligt (Reddy et al. 1999; Oetjen et al. 2006; Börchers et al. 2008) und damit ein wichtiger Faktor für den Zytokin-induzierten Zelluntergang in der Pathogenese des Diabetes mellitus (Typ 2). Medikamentöse Ansätze dieser inflammatorischen Komponente der Erkrankung mit Zytokin-Hemmstoffen entgegenzuwirken, konnten erste Erfolge verzeichnen, bedürfen aber noch weiterer Erforschung. Zwar werden diese Medikamente bereits bei besonders schweren Verläufen im Rahmen der rheumatoiden Arthritis und bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt (Lüllmann et al. 2006), das Nebenwirkungsprofil ist jedoch nicht zu unterschätzen. Eine Möglichkeit, selektiver vorzugehen und die Nebenwirkungen geringer zu halten, wäre der Einsatz von Hemmstoffen, die gegen intrazelluläre Ziele gerichtet sind und eine gewisse Gewebespezifität aufweisen. Damit erscheint die DLK als ein mögliches Ziel für eine medikamentöse Therapie zur Eindämmung des Zelluntergangs der Betazellen. Es sind aber noch viele Fragen offen, die sich unter anderem aus den bisherigen Daten ergeben: Obgleich IL-1 β allein keine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität der DLK zu haben scheint, könnte eine Kombination der Zytokine, wie sie physiologisch vorkommt, zu einem synergistischen Effekt auf die DLK in der pankreatischen Betazelle führen. Während bekannt ist, dass die intrazelluläre Signaltransduktion der Zytokin-Rezeptoren zur Vermittlung mit dem MAPK-Signalweg der TRAF-Familie bedarf (Wajant et al. 2001), wurde bisher keine direkte Interaktion mit der DLK gezeigt. Der Nachweis einer solchen Interaktion würde weitere Einblicke in Bezug auf die Regulation der DLK bieten und die Zytokin-induzierte Aktivierung der DLK zusätzlich stützen. Auch die Rolle des Gerüstproteins JIP-1 für die Änderung der subzellulären Lokalisation der DLK sollte weiter untersucht werden. Durch die Einwirkung der Zytokine kommt es zu einer Reduktion der DLK, aller Wahrscheinlichkeit

nach durch proteasomale Degradation. Es bleibt aber offen, welcher Mechanismus diesem Abbau in den Betazellen zugrunde liegt, ob z. B. wie in den Fibroblasten Hitzeschockproteine beteiligt sind (Daviau et al. 2006), und ob eine Möglichkeit besteht, in diesen Prozess einzugreifen und ihn zu steuern. Die vorliegenden Ergebnisse konnten uns der Rolle der DLK in der Pathogenese des Diabetes mellitus näherbringen, weitere wichtige Erkenntnisse werden in Zukunft aus der (teilweisen) Ausschaltung der Proteinkinase im Tiermodell und aus humanem Pankreas-Gewebe zu ziehen sein.

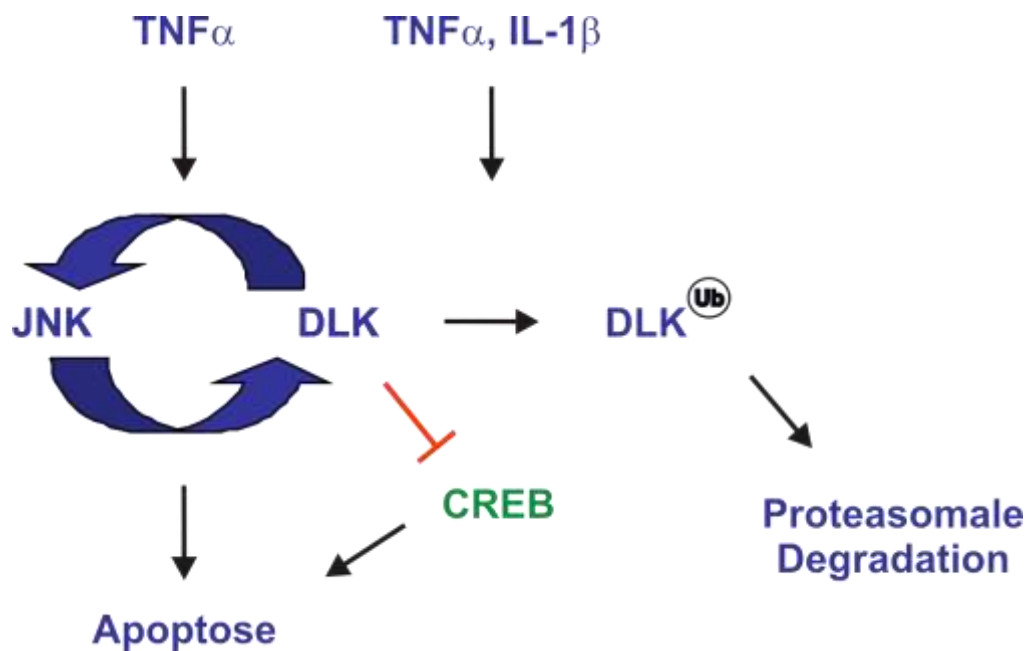


Abb. 4.1: Auswirkung der Zytokine TNF α und IL-1 β auf die DLK. Durch die Einwirkung von TNF α kommt es zu einer Aktivierung der katalytischen Funktion der DLK. Die DLK ist neben der Aktivierung der JNK mit ihren proapoptotischen Einflüssen auch an der Inhibition des Transkriptionsfaktors CREB beteiligt, wodurch dessen antiapoptotische Funktion reduziert wird. DLK und JNK sind als Bestandteile des MAPK-Signalweges in einer signal-amplifizierenden Feedback-Schleife miteinander verbunden. TNF α und IL-1 β führen in Abhängigkeit von der katalytischen Funktion der DLK zu ihrer Reduktion, aller Wahrscheinlichkeit nach, durch Ubiquitinierung (DLK^{Ub}) mit nachfolgender proteasomaler Degradation.

5 Zusammenfassung

Beim Diabetes mellitus Typ 2 kommt es durch eine Dysbalance von Replikation und Apoptose der pankreatischen Betazellen sowie durch eine periphere Insulinresistenz zu einer gestörten Glukosehomöostase. Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β sind dabei wichtige pathogene Effektoren, wobei die Signaltransduktion, über die sie auf die Betazellen wirken, noch nicht vollständig geklärt ist. Die MAP3K DLK ist eine wichtige Komponente in der Regulation des programmierten Zelltodes, da sie neben der Aktivierung der JNK mit ihren proapoptotischen Einflüssen auch den Transkriptionsfaktor CREB inhibiert, wodurch dessen antiapoptotische Funktion reduziert wird.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss besagter Zytokine auf die katalytische Funktion der DLK und auf die ihr im MAPK-Signalweg untergeordnete JNK in der insulinproduzierenden Betazelllinie HIT-T15 untersucht. In in-vitro-Kinase-Assays mit immunpräzipitierter DLK konnte eine TNF α -induzierte Aktivierung der katalytischen Funktion der DLK nachgewiesen werden und durch Reduktion der zellulären DLK in Folge des Einsatzes von DLK-RNAi zeigte sich eine Beteiligung dieser Proteinkinase an dem TNF α -induzierten JNK-Signalweg. Des Weiteren kam es unter der Inhibition der JNK zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität der DLK, was die Vorstellung stützt, dass diese Bestandteile des MAPK-Signalweges in einer Signal-amplifizierenden Feedback-Schleife miteinander verbunden sind. Für die Beteiligung der DLK an der IL-1 β -induzierten JNK-Aktivierung konnten in den analog zu den Versuchen mit TNF α durchgeführten in-vitro-Kinase-Assays keine Belege gefunden werden, somit sind andere MAP3Ks für die Aktivierung der JNK in den HIT-T15-Zellen zu erwägen. Beide Zytokine führen im Immunoblot-Verfahren zu einer Reduktion der DLK-Proteinmenge, eventuell im Rahmen eines Schutzmechanismus der Betazellen. Diese Reduktion wird eher durch proteasomale Degradation des Proteins als durch eine Hemmung der Proteinsynthese verursacht und erfolgt nur in Abhängigkeit der intakten katalytischen Funktion der DLK.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die DLK in Abhängigkeit von ihrer katalytischen Funktion an dem Zytokin-induzierten Untergang der Betazellen beteiligt ist.

6 Anhang

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

**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 Börchers, 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 Börchers, 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 Börchers, Elke Oetjen

Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

9. Insel-Workshop, Greifswald 27.03.-29.03.2009

Effect of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β on the dual-leucine-zipper-bearing kinase in beta cells

Catarina Klimpel, Elke Oetjen

Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, D-37085 Göttingen

7 Literaturverzeichnis

- Abrams B, Grill B, Huang X, Jin Y (2008):** Cellular and molecular determinants targeting the *Caenorhabditis elegans* PHR protein RPM-1 to perisynaptic regions. *Dev Dyn* 237: 630-9
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000):** The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275: 9047-54
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF (2002):** Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277: 1531-7
- Akira S, Takeda K (2004):** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511
- 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: 1468-76
- Andersen NA, Larsen CM, Mandrup-Poulsen T (2000):** TNFalpha and IFNgamma potentiate IL-1beta induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans. *Diabetologia* 43: 1389-96
- Ashcroft SJ, Hammonds P, Harrison DE (1986):** Insulin secretory responses of a clonal cell line of simian virus 40-transformed B cells. *Diabetologia* 29: 727-33
- Assuncao Guimaraes C, Linden R (2004):** Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271: 1638-50
- Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001):** Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358: 221-9
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P (2003):** The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371: 199-204
- Beere HM (2004):** "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117: 2641-51
- Bell GI, Polonsky KS (2001):** Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414: 788-91
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y (2001):** SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13681-6

- Bjorklund A, Lansner A, Grill VE (2000):** Glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ abnormalities in human pancreatic islets: important role of overstimulation. *Diabetes* 49: 1840-8
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S (1997):** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-33
- Blouin R, Beaudoin J, Bergeron P, Nadeau A, Grondin G (1996):** Cell-specific expression of the ZPK gene in adult mouse tissues. *DNA Cell Biol* 15: 631-42
- Bonny C, Nicod P, Waeber G (1998):** IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 273: 1843-6
- Bonny C, Oberson A, Steinmann M, Schorderet DF, Nicod P, Waeber G (2000):** IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 275: 16466-72
- Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF (2001):** Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50: 77-82
- Boraschi D, Tagliabue A (2006):** The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm* 74: 229-54
- Bowman AB, Kamal A, Ritchings BW, Philp AV, McGrail M, Gindhart JG, Goldstein LS (2000):** Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell* 103: 583-94
- Börchers S, Klimpel C, Blume R, Oetjen E (2008):** The activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase DLK contributes to the damaging effects of TNF α on pancreatic islet beta-cells. German Institute of Human Nutrition (DIfE) Symposium - Genetics and Pathophysiology of Type 2 Diabetes, 30 (Abstract zum Poster)
- Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Brancho D, Ventura JJ, Jaeschke A, Doran B, Flavell RA, Davis RJ (2005):** Role of MLK3 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Cell Biol* 25: 3670-81
- 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: 102-10
- Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994):** Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* 14: 7352-62
- Chadee DN, Kyriakis JM (2004):** MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol* 6: 770-6

- Chang I, Kim S, Kim JY, Cho N, Kim YH, Kim HS, Lee MK, Kim KW, Lee MS (2003):** Nuclear factor kappaB protects pancreatic beta-cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *Diabetes* 52: 1169-75
- Chang L, Karin M (2001):** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40
- Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M (2006):** The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124: 601-13
- Chaparro RJ, Konigshofer Y, Beilhack GF, Shizuru JA, McDevitt HO, Chien YH (2006):** Nonobese diabetic mice express aspects of both type 1 and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12475-80
- Chen X, Rzhetskaya M, Kareva T, Bland R, During MJ, Tank AW, Kholodilov N, Burke RE (2008):** Antiapoptotic and trophic effects of dominant-negative forms of dual leucine zipper kinase in dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurosci* 28: 672-80
- Collins CA, Wairkar YP, Johnson SL, DiAntonio A (2006):** Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* 51: 57-69
- Dagert M, Ehrlich SD (1979):** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6: 23-8
- Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T (1998):** Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2907-10
- Das S, Cho J, Lambertz I, Kelliher MA, Eliopoulos AG, Du K, Tschlis PN (2005):** Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* 280: 23748-57
- Daviau A, Proulx R, Robitaille K, Di Fruscio M, Tanguay RM, Landry J, Patterson C, Durocher Y, Blouin R (2006):** Down-regulation of the mixed-lineage dual leucine zipper-bearing kinase by heat shock protein 70 and its co-chaperone CHIP. *J Biol Chem* 281: 31467-77
- Daviau A, Di Fruscio M, Blouin R (2009):** The mixed-lineage kinase DLK undergoes Src-dependent tyrosine phosphorylation and activation in cells exposed to vanadate or platelet-derived growth factor (PDGF). *Cell Signal* 21: 577-87
- Davis RJ (2000):** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-52

- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995):** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267: 682-5
- Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL (1996):** Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 271: 7273-6
- Dinarello CA (1991):** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-52
- Dinarello CA (1998):** Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16: 457-99
- Dinarello CA (2005):** Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 201: 1355-9
- Dinarello CA (2007):** Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S34-45
- Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, Steffen Hermann T, Ihlemann N, Baunbjerg Nielsen D, Spohr C, Kober L, Vaag A, Torp-Pedersen C (2005):** Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res* 42: 517-25
- Donath MY, Halban PA (2004):** Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47: 581-9
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999):** Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48: 738-44
- Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T (2003):** Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81: 455-70
- Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T (2008):** Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev* 29: 334-50
- Dorow DS, Devereux L, Dietzsch E, De Kretser T (1993):** Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur J Biochem* 213: 701-10
- Douziech M, Laberge G, Grondin G, Daigle N, Blouin R (1999):** Localization of the mixed-lineage kinase DLK/MUK/ZPK to the Golgi apparatus in NIH 3T3 cells. *J Histochem Cytochem* 47: 1287-96
- Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, Welsh N (1996):** The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 39: 875-90

- Esch T, Stefano G (2002):** Proinflammation: a common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. *Med Sci Monit* 8: HY1-9
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003):** Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52: 1-8
- Fan G, Merritt SE, Kortenjann M, Shaw PE, Holzman LB (1996):** Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* 271: 24788-93
- Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL (1997):** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* 7: 67-74
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S (1995):** Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44: 249-56
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS (1998):** Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 847-50
- Gallo KA, Johnson GL (2002):** Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 663-72
- Gallo KA, Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Godowski PJ (1994):** Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J Biol Chem* 269: 15092-100
- Garrington TP, Johnson GL (1999):** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11: 211-8
- Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD (2000):** Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem* 275: 36509-13
- Gleason CE, Gonzalez M, Harmon JS, Robertson RP (2000):** Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E997-1002
- Glickman MH, Ciechanover A (2002):** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428
- Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Martin J, Llorca J (2006):** Influence of anti-TNF-alpha infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 24: 373-9

- Gotoh I, Adachi M, Nishida E (2001):** Identification and characterization of a novel MAP kinase kinase kinase, MLTK. *J Biol Chem* 276: 4276-86
- Grill V, Bjorklund A (2001):** Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes* 50 Suppl 1: S122-4
- Guiot Y, Sempoux C, Moulin P, Rahier J (2001):** No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50 Suppl 1: S188
- Gutkind JS (1998):** The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 273: 1839-42
- Haefliger JA, Tawadros T, Meylan L, Gurun SL, Roehrich ME, Martin D, Thorens B, Waeber G (2003):** The scaffold protein IB1/JIP-1 is a critical mediator of cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *J Cell Sci* 116: 1463-9
- Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM, Bastiani M (2009):** Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* 323: 802-6
- Hammonds P, Beggs M, Beresford G, Espinal J, Clarke J, Mertz RJ (1990):** Insulin-secreting beta-cells possess specific receptors for interleukin-1 beta. *FEBS Lett* 261: 97-100
- 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: 111-26
- Harmon JS, Stein R, Robertson RP (2005):** Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280: 11107-13
- Hauner H, Bender M, Haastert B, Hube F (1998):** Plasma concentrations of soluble TNF-alpha receptors in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1239-43
- Heitmeier MR, Arnush M, Scarim AL, Corbett JA (2001):** Pancreatic beta-cell damage mediated by beta-cell production of interleukin-1. A novel mechanism for virus-induced diabetes. *J Biol Chem* 276: 11151-8
- Higuchi M, Aggarwal BB (1994):** TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol* 152: 3550-8
- Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G, Ohno S (1996):** Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12: 641-50
- Hirai S, Kawaguchi A, Hirasawa R, Baba M, Ohnishi T, Ohno S (2002):** MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. *Development* 129: 4483-95

- 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: 11992-2002
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002):** A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-6
- Holland PM, Suzanne M, Campbell JS, Noselli S, Cooper JA (1997):** MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *J Biol Chem* 272: 24994-8
- Holzman LB, Merritt SE, Fan G (1994):** Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 269: 30808-17
- Horiuchi D, Collins CA, Bhat P, Barkus RV, Diantonio A, Saxton WM (2007):** Control of a kinesin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr Biol* 17: 1313-7
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993):** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995):** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-15
- Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R (2003):** Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-55
- Hypponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, Akerblom HK (2000):** Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 23: 1755-60
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997):** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275: 90-4
- Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y (1999):** Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 927-32
- Ing YL, Leung IW, Heng HH, Tsui LC, Lassam NJ (1994):** MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene* 9: 1745-50

- Ip YT, Davis RJ (1998):** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10: 205-19
- Jaattela M, Wissing D (1993):** Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* 177: 231-6
- Jesenberger V, Jentsch S (2002):** Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 112-21
- Jhala US, Canettieri G, Screatton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M (2003):** cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 17: 1575-80
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB (1999):** Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48: 241-53
- 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: 30010-8
- Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y (2005):** Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* 83: 429-39
- Karcher RL, Deacon SW, Gelfand VI (2002):** Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* 12: 21-7
- Keahey HH, Rajan AS, Boyd AE, 3rd, Kunze DL (1989):** Characterization of voltage-dependent Ca²⁺ channels in beta-cell line. *Diabetes* 38: 188-93
- Keil U, Kuulasmaa K (1989):** WHO MONICA Project: risk factors. *Int J Epidemiol* 18: S46-55
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB (1995):** The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95: 2111-9
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G (2001):** Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E745-51
- King GL (2008):** The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 79: 1527-34
- Klee CB, Crouch TH, Krinks MH (1979):** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6270-3

- Klimpel C, Börchers S, Oetjen E (2009):** Induction of beta-cell apoptosis by the proinflammatory cytokine IL-1beta not involving the apoptosis-inducing dual leucine zipper bearing kinase DLK. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379, 37
- Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU (1985):** Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4: 110-25
- Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P (1993):** Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 30: 1443-53
- Kutschenko A:** Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Calcineurin-Phosphatase, Dual-Leucine-Zipper-Bearing-Kinase (DLK), Insulingentranskripton und Vitalität einer pankreatischen β -Zelllinie. *Med. Diss. Göttingen* 2007
- Kyriakis JM, Avruch J (1996):** Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 271: 24313-6
- Kyriakis JM, Avruch J (2001):** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-69
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994):** The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-60
- Laine A, Ronai Z (2005):** Ubiquitin chains in the ladder of MAPK signaling. *Sci STKE* 2005: re5
- Lamb JA, Ventura JJ, Hess P, Flavell RA, Davis RJ (2003):** JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* 11: 1479-89
- Lambert DG, Atkins TW (1989):** Cholinergic stimulation of insulin release from cloned B-cell lines HIT-T15 and RINm5F. *Acta Diabetol Lat* 26: 27-34
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007):** Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 1517-26
- Lazar MA (2005):** How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307: 373-5
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE (2006):** Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17: 1807-19
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF (2003):** c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278: 2896-902

- Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O (1997):** New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417: 150-2
- 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: 32408-15
- Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW (2000):** Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5818-23
- Lewcock JW, Genoud N, Lettieri K, Pfaff SL (2007):** The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. *Neuron* 56: 604-20
- Ling Z, Van de Casteele M, Dong J, Heimberg H, Haefliger JA, Waeber G, Schuit F, Pipeleers D (2003):** Variations in IB1/JIP1 expression regulate susceptibility of beta-cells to cytokine-induced apoptosis irrespective of C-Jun NH2-terminal kinase signaling. *Diabetes* 52: 2497-502
- Liu J, Lin A (2005):** Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15: 36-42
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991):** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-15
- Liu TC, Huang CJ, Chu YC, Wei CC, Chou CC, Chou MY, Chou CK, Yang JJ (2000):** Cloning and expression of ZAK, a mixed lineage kinase-like protein containing a leucine-zipper and a sterile-alpha motif. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 811-6
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L:** *Pharmakologie und Toxikologie*. 16. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- 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: 851-60
- Maedler K, Sergeev P, Ehses JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY (2004):** Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8138-43
- Maedler K, Schumann DM, Sauter N, Ellingsgaard H, Bosco D, Baertschiger R, Iwakura Y, Oberholzer J, Wollheim CB, Gauthier BR (2006):** Low concentration of

interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55: 2713-22

Major CD, Wolf BA (2001): Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* 50: 2721-8

Mandrup-Poulsen T (2003): Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 66: 1433-40

Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Dinarello CA, Nerup J (1987): Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity. *J Immunol* 139: 4077-82

Maroney AC, Finn JP, Connors TJ, Durkin JT, Angeles T, Gessner G, Xu Z, Meyer SL, Savage MJ, Greene LA (2001): Cep-1347 (KT7515), a semisynthetic inhibitor of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* 276: 25302-8

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: 16888-96

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

McDonough H, Patterson C (2003): CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8: 303-8

Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimacopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM (2002): IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1184-8

Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM (1999): Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10403-8

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: 10195-202

Miller BR, Press C, Daniels RW, Sasaki Y, Milbrandt J, DiAntonio A (2009): A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat Neurosci* 12: 387-9

Mochly-Rosen D (1995): Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268: 247-51

- Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB (1993):** Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151: 1548-61
- Mosselmans R, Hepburn A, Dumont JE, Fiers W, Galand P (1988):** Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J Immunol* 141: 3096-100
- Nadeau A, Grondin G, Blouin R (1997):** In situ hybridization analysis of ZPK gene expression during murine embryogenesis. *J Histochem Cytochem* 45: 107-18
- Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD, Jin Y (2005):** Regulation of a DLK-1 and p38 MAP kinase pathway by the ubiquitin ligase RPM-1 is required for presynaptic development. *Cell* 120: 407-20
- Naujokat C, Hoffmann S (2002):** Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82: 965-80
- Nichols GA, Arondekar B, Herman WH (2008):** Complications of dysglycemia and medical costs associated with nondiabetic hyperglycemia. *Am J Manag Care* 14: 791-8
- 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: 7273-9
- Nihalani D, Meyer D, Pajni S, Holzman LB (2001):** Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. *EMBO J* 20: 3447-58
- 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: 28694-702
- Obrig TG, Gottlieb D (1970):** In vitro protein synthesis and aging in *Rhizoctonia solani*. *J Bacteriol* 101: 755-62
- 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: 27036-44
- Oetjen E, Grapentin D, Blume R, Seeger M, Krause D, Eggers A, Knepel W (2003):** Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367: 227-36
- 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: 332-42

Park EC, Glodowski DR, Rongo C (2009): The ubiquitin ligase RPM-1 and the p38 MAPK PMK-3 regulate AMPA receptor trafficking. *PLoS One* 4: e4284

Pavlovic D, Andersen NA, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL (2000): Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur Cytokine Netw* 11: 267-74

Plaumann S: Wirkung des Immunsuppressivums Cyclosporin A und der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase auf das Überleben pankreatischer Beta-Zellen. Med. Diss. Göttingen 2007

Plaumann S, Blume R, Borchers S, Steinfeldt HJ, Knepel W, Oetjen E (2008): Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of beta-cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A. *Mol Pharmacol* 73: 652-9

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

Po MD, Hwang C, Zhen M (2010): PHRs: bridging axon guidance, outgrowth and synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 20: 100-7

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A (1988): Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes* 37: 133-6

Rabinovitch A, Sumoski W, Rajotte RV, Warnock GL (1990): Cytotoxic effects of cytokines on human pancreatic islet cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 152-6

Raman M, Chen W, Cobb MH (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26: 3100-12

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe – Biochemie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006

Rath PC, Aggarwal BB (1999): TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350-64

Reddy UR, Pleasure D (1994): Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 613-20

- Reddy UR, Basu A, Bannerman P, Ikegaki N, Reddy CD, Pleasure D (1999):** ZPK inhibits PKA induced transcriptional activation by CREB and blocks retinoic acid induced neuronal differentiation. *Oncogene* 18: 4474-84
- Rhodes CJ (2005):** Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307: 380-4
- Robitaille K, Daviau A, Tucholski J, Johnson GV, Rancourt C, Blouin R (2004):** Tissue transglutaminase triggers oligomerization and activation of dual leucine zipper-bearing kinase in calphostin C-treated cells to facilitate apoptosis. *Cell Death Differ* 11: 542-9
- Robitaille K, Daviau A, Lachance G, Couture JP, Blouin R (2008):** Calphostin C-induced apoptosis is mediated by a tissue transglutaminase-dependent mechanism involving the DLK/JNK signaling pathway. *Cell Death Differ* 15: 1522-31
- Roffler-Tarlov S, Brown JJ, Tarlov E, Stolarov J, Chapman DL, Alexiou M, Papaioannou VE (1996):** Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. *Development* 122: 1-9
- Rosenvinge A, Krogh-Madsen R, Baslund B, Pedersen BK (2007):** Insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis: effect of anti-TNFalpha therapy. *Scand J Rheumatol* 36: 91-6
- Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, Barker PA (2002):** K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem* 277: 49473-80
- Rusnak F, Mertz P (2000):** Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80: 1483-521
- Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T (2003):** NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 22: 3898-909
- Sakuma H, Ikeda A, Oka S, Kozutsumi Y, Zanetta JP, Kawasaki T (1997):** Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *J Biol Chem* 272: 28622-9
- Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S (2002):** Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45: 85-96
- Saldeen J, Lee JC, Welsh N (2001):** Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. *Biochem Pharmacol* 61: 1561-9
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP (1981):** Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4339-43
- Sathyanarayana P, Barthwal MK, Kundu CN, Lane ME, Bergmann A, Tzivion G, Rana A (2002):** Activation of the Drosophila MLK by ceramide reveals TNF-alpha and ceramide as agonists of mammalian MLK3. *Mol Cell* 10: 1527-33
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S (2005):** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6: 1087-95
- Schachter KA, Du Y, Lin A, Gallo KA (2006):** Dynamic positive feedback phosphorylation of mixed lineage kinase 3 by JNK reversibly regulates its distribution to Triton-soluble domains. *J Biol Chem* 281: 19134-44
- Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M, Kronke M (1999):** Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem* 274: 10203-12
- Schwaninger M, Schofl C, Blume R, Rossig L, Knepel W (1995a):** Inhibition by antidepressant drugs of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-directed gene transcription. *Mol Pharmacol* 47: 1112-8
- Schwaninger M, Blume R, Kruger M, Lux G, Oetjen E, Knepel W (1995b):** Involvement of the Ca(2+)-dependent phosphatase calcineurin in gene transcription that is stimulated by cAMP through cAMP response elements. *J Biol Chem* 270: 8860-6
- Seamon KB, Daly JW (1981):** Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J Cyclic Nucleotide Res* 7: 201-24
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981):** Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3363-7
- See RH, Calvo D, Shi Y, Kawa H, Luke MP, Yuan Z (2001):** Stimulation of p300-mediated transcription by the kinase MEKK1. *J Biol Chem* 276: 16310-7
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW (2003):** Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6347-52
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990):** Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571-82

- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N (2005):** TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19: 2668-81
- Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1994):** Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol* 14: 8376-84
- Spinas GA, Palmer JP, Mandrup-Poulsen T, Andersen H, Nielsen JH, Nerup J (1988):** The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic beta-cells--stimulation followed by inhibition--depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration. *Acta Endocrinol (Copenh)* 119: 307-11
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005):** Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-46
- Su B, Karin M (1996):** Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8: 402-11
- Swenson KI, Winkler KE, Means AR (2003):** A new identity for MLK3 as an NIMA-related, cell cycle-regulated kinase that is localized near centrosomes and influences microtubule organization. *Mol Biol Cell* 14: 156-72
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A (2001):** Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 414: 313-7
- Taniguchi T (1995):** Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251-5
- 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: 1985-92
- Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H (2001):** ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2: 222-8
- Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ (1999):** The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol* 19: 1569-81
- Trujillo G, Nakata K, Yan D, Maruyama IN, Jin Y (2010):** A ubiquitin E2 variant protein acts in axon termination and synaptogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 186: 135-45
- Unger RH, Orci L (2001):** Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15: 312-21
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997):** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-4

- Varfolomeev EE, Ashkenazi A (2004):** Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116: 491-7
- Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ (2006):** Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21: 701-10
- Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B (2001):** Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* 152: 959-70
- Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widmann C, Maillard A, Miklossy J, Dina C, Hani EH (2000):** The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet* 24: 291-5
- Wajant H, Henkler F, Scheurich P (2001):** The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13: 389-400
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003):** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65
- Wallbach M:** Identifikation einer funktionellen Kerner kennungssequenz in der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase. Med. Diss. Göttingen 2010
- Warren JS (1990):** Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 28: 37-59
- Weston CR, Davis RJ (2007):** The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19: 142-9
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1998):** Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 23: 481-5
- Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ (1998):** A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281: 1671-4
- Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA (2001):** Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 15: 2421-32
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999):** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143-80
- 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: 1047-53
- Wilkin TJ (2001):** The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 44: 914-22

- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI (1998):** Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-4
- Witowsky JA, Johnson GL (2003):** Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem* 278: 1403-6
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980):** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306
- Xia Y, Makris C, Su B, Li E, Yang J, Nemerow GR, Karin M (2000):** MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5243-8
- 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: 4713-24
- 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: 252-61
- 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: 9949-59
- Yan D, Wu Z, Chisholm AD, Jin Y (2009):** The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration. *Cell* 138: 1005-18
- Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ (1999):** The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 19: 7245-54
- Yazdani-Biuki B, Stelzl H, Brezinschek HP, Hermann J, Mueller T, Krippel P, Graninger W, Wascher TC (2004):** Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Eur J Clin Invest* 34: 641-2
- Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitso Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y (2000):** MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7272-7
- Zhang S, Kim KH (1995):** TNF-alpha inhibits glucose-induced insulin secretion in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *FEBS Lett* 377: 237-9
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994):** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-32

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001): Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-7

Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J (2003): Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis* 62: 561-4

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Elke Oetjen für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Forschungsthemas sowie die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit, die sich in zahlreichen wertvollen Anregungen und lehrreichen Diskussionen widerspiegelte. Ebenfalls möchte ich mich für die geduldige Durchsicht und Beratung bei der Verfassung dieser Arbeit sowie bei der Ausarbeitung von Präsentationen bedanken. Ihr großes Engagement und ihre stete Motivation waren für mich von großer Bedeutung.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie ist die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu verdanken. Für die Einführung in die experimentellen Methoden sei an dieser Stelle der MTA Herr Roland Blume besonders hervorgehoben. Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. rer. nat. Annette Heinrich für die anregenden Diskussionen, die stets neue Denkanstöße brachten sowie ihre schnelle und unkomplizierte Hilfe in EDV-Fragen.

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

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Eltern und meiner Familie, die mir das Studium und diese Dissertation erst ermöglichten und mir stets den nötigen Rückhalt gaben beides erfolgreich abzuschließen.

