

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Regulation der Genexpression in Insulinoma-Zellen und β -Zellen des Pankreas

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von

Isabelle Müller

geboren am 14.12.1982 in Zweibrücken

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Vorsitzender:

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel

Prof. Dr. Frank Schmitz

Akad. Mitarbeiter:

*Die Wissenschaft ist voller Irrtümer, die man aber nicht zu scheuen braucht, weil sie uns
trotzdem der Wahrheit näher bringen.*

Aus Jules Vernes „Reise zum Mittelpunkt der Erde“

	Seite
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1 Evolution der Zellkommunikation	11
1.2 Die Regulation der β -Zellen des Pankreas	11
1.2.1 Die Regulation der β -Zellen des Pankreas durch Glukose	11
1.2.2 <i>Second messenger</i> Calcium als Teil der Signalkaskade	17
1.3 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien und Feinchemikalien	22
2.1.4 Enzyme und Puffer	24
2.1.5 Kits	25
2.1.6 E.coli-Stämme	25
2.1.7 Plasmide und Vektoren	25
2.1.8 Zelllinien	30
2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellkultur	32
2.2.2 Antikörper	34
2.3 Primer	35
2.3.1 Primer für die Genotypisierung	35
2.3.2 Primer für RT-PCR	36
2.4 RNA-Methoden	37
2.4.1 RNA-Isolierung	37
2.4.2 RNA-Messung	37
2.4.3 cDNA-Synthese	38
2.5 DNA-Methoden	38
2.5.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	38
2.5.2 Horizontale Agarosegelelektrophorese	40

2.5.3	Dokumentation und Analyse der DNA	40
2.5.4	Quantitative Realtime-PCR	40
2.5.5	Ortsspezifische Mutagenese	42
2.5.6	Transformation von Plasmiden in E.coli	45
2.5.7	Blue-White-Screening	45
2.5.8	Mini-Plasmidpräparation	45
2.5.9	Maxi-Plasmidpräparation	46
2.5.10	Quiagen-Maxi	46
2.5.11	Restriktion von DNA	47
2.5.12	Reinigen der DNA: Phenol-Chloroform-Extraktion	48
2.6	Manipulation eukaryontischer Zellen durch lentivirale Infektion	48
2.6.1	Produktion von Lentiviren mittels Calciumphosphat-Transfektion in 293T/17	48
2.6.2	Lentivirale Infektion	49
2.6.3	Reportergenanalysen	50
2.6.4	Retrovirale Infektion zur Generierung stabiler Zelllinien	51
2.7	Proteinbiochemische Methoden	52
2.7.1	ELISA	52
2.7.2	Bestimmung der Apoptose – Caspase 3/7-Assay	53
2.7.3	Zellernte, Kernextraktion und Gesamtzellextraktion	53
2.7.4	Proteinbestimmung	54
2.7.5	Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.7.6	Western Blot von SDS-Gelen	56
2.7.7	Immunzytochemischer Nachweis der Proteine	57
2.8	<i>In vivo</i> -Analyse: Maus	58
2.8.1	Mausstämme	58
2.8.2	Mausmodell	58
2.8.3	Genotypisierung	61
2.8.4	Dissektion des Pankreas und Isolierung von Inseln	61
2.8.5	Western Blot zum Nachweis der Expression der Transgene	62
2.8.6	Messung /Bestimmung der β -Zell-Fläche	63
2.8.7	Histologie und Immunohistochemie	63
2.8.8	Blutentnahme	65
2.8.9	Intraperitonealer Glukosetoleranztest (IPGTT)	65
2.8.10	X-Gal -Histochemie	66
2.8.11	Zell-Proliferation-Assay	66

3 Ergebnisse	68
3.1 Signaltransduktion von Glukose in Insulinoma-Zellen	68
3.1.1 Regulation der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen	68
3.1.2 Rolle der Ca ²⁺ -Mikrodomänen bei der Glukose-regulierten Gentranskription von bZIP-Transkriptionsfaktoren in Insulinoma-Zellen	85
3.2 Signaltransduktion von Pregnenolonsulfat in Insulinoma-Zellen	101
3.2.1 Stimulierung der INS-1-Zellen mit Pregnenolonsulfat induziert die Biosynthese von Egr-1	101
3.2.2 Stimulation mit Pregnenolonsulfat erhöht die Egr-1-mRNA Konzentration von isolierten Inseln des Pankreas	102
3.2.3 TRPM3 ist für eine Pregnenolonsulfat-stimulierte Egr-1-Expression der in 2 mM-Glukose-haltigem Medium kultivierten INS-1-Zellen erforderlich	103
3.2.4 Hemmung der spannungsgesteuerten Ca ²⁺ -Kanäle blockiert die Pregnenolonsulfat-induzierte Expression von Egr-1 in INS-1 Insulinoma- Zellen	104
3.2.5 Expression von TRPM3 und die spannungsgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle in isolierten Inseln, Insulinoma-Zellen und hypophysären Zellen	105
3.2.6 Pregnenolonsulfat aktiviert AP-1 und bZIP-Transkriptionsfaktoren in Insulinoma-Zellen	107
3.2.7 Erhöhung der c-Jun und c-Fos-Expression in Pregnenolonsulfat- stimulierten Insulinoma-Zellen und isolierten β -Zellen aus dem Pankreas	108
3.2.8 Eine erhöhte c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität in Pregnenolonsulfat- stimulierten Insulinoma-Zellen	109
3.2.9 Das SRE und das CRE dienen als Pregnenolonsulfat-sensitive, genetische Kontrollelemente im menschlichen c-Fos-Promotor	110
3.2.10 Phosphorylierung von CREB und Stimulation der CRE-regulierten Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen	112
3.2.11 TRPM3 ist zur Erhöhung der Pregnenolonsulfat-vermittelten c-Jun- und c- Fos Expression sowie der CRE-regulierten Reporterogenaktivität notwendig	112
3.2.12 Spannungsgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle des L-Typs spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma- Zellen	115
3.2.13 Bedeutende Rolle von extrazellulären und intrazellulären Ca ²⁺ -Ionen in Pregnenolonsulfat-induzierter Erhöhung der CRE-kontrollierten Transkription in INS-1-Zellen	118
3.2.14 Aktivierung von ERK ist unerlässlich für die Induktion der bZIP-vermittelten Biosynthese in Pregnenolonsulfat-stimulieren INS-1-Zellen	119

3.2.15 Erhöhte Expression des Pdx-1-Gens in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen	120
3.3 Regulation der Insulinbiosynthese, des Blutglukosespiegels und der Proliferation in β -Zellen des Pankreas durch Egr-Transkriptionsfaktoren	121
3.3.1 Bedeutende Rolle des Transkriptionsfaktors Egr <i>in vivo</i>	121
3.3.2 Rolle des Transkriptionsfaktors Elk <i>in vivo</i>	132
4 Diskussion	135
4.1 Signaltransduktion von Glukose in Insulinoma-Zellen	135
4.1.1 Regulation der Transkription durch Glukose in INS-1-Zellen	135
4.1.2 Rolle der Ca^{2+} -Mikrodomänen bei der Glukose-regulierten Gentranskription in Insulinoma-Zellen	137
4.2 Signaltransduktion von Pregnenolonsulfat in INS-1-Zellen	140
4.3 Regulation der Insulinbiosynthese, des Blutglukosespiegels und der Proliferation in β -Zellen des murinen Pankreas	143
4.3.1 Die zentrale Rolle der Egr-Transkriptionsfaktoren	143
4.3.2 Die Rolle des Transkriptionsfaktors Elk-1 <i>in vivo</i>	145
5 Zusammenfassung	147
6 Summary	148
7 Literaturverzeichnis	149
8 Puplicationen und Poster	162
9 Danksagung	164

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
°C	Grad Celsius
4OHT	4-Hydroxytamoxifen
A	Ampère
A. dest.	<i>Aqua destillatum</i>
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bZIP	<i>basic leucin zipper protein</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	Choriongonadotropin
CMV	Cytomegalo-Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
coll	Kollagenase
CRE	<i>cAMP-response-element</i>
CREB	<i>cAMP-response-element-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerin
dbcAMP	Dibutyryl-zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
dest.	destilliert
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Egr-1	<i>early growth response factor 1</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay kit</i>
ER	Östrogen-Rezeptor, endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FE	Eisen
FLAP	<i>HIV-flap element</i>
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon

g	Gramm
G-Protein	heterotrimeres, GTP-bindendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GVol	Gesamtvolumen
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP3	Inositol-1,4,5,-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LTR	long terminal repeat
LU	Lightunits
luc	Luziferase
M	Molar
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
Pdx-1	<i>pancreas duodenum homeobox-1</i>
PKA/C	Proteinkinase A/C
RIP	Ratten-InsulinII-Promotor
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
rtTA	reverser Tet-gesteuerter Transaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH2	Src homology domain
SOS	Son of Sevenless
SRE	<i>serum response element</i>
ss-DNA	<i>single-strand DNA</i>
SV	Similian Virus
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline + Tween</i>
TCF	<i>ternary complex factors</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TetO	<i>Tet Operator Sequenz</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsible element

TRP	<i>transient receptor potential</i>
TSA	Trichostatin A
U	Unit
URE	<i>upstream regulator element</i>
UV	Ultraviolet
V	Volt
VDCC	<i>voltage-dependent calcium channels</i>
Vol.	Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WPRE	Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element
x g	x Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm 10 ⁻³ Milligramm
µl	Mikroliter 10 ⁻³ Milliliter
µM	Mikromolar 10 ⁻⁶ Molar
µm	Mikrometer 10 ⁻⁶ Meter

1 Einleitung

1.1 Evolution der Zellkommunikation

Mit der Evolution von einzelligen zu vielzelligen Eukaryonten entwickelte sich ein komplexer Organismus mit Zellgruppen gleicher genetischer Informationen, jedoch unterschiedlicher Funktionen und Morphologien. Diese Diversität resultiert aus den zellspezifischen Proteinen und wird durch die Regulationsmechanismen der Proteinbiosynthese ermöglicht. Die Hauptkontrollpunkte sind die Transkription und Translation, wobei RNA-Splicing, mRNA-Transport und -Degradation sowie epigenetische Modifikationen auch Regulationsmöglichkeiten der zellspezifischen Genexpression darstellen. Die Transkriptionsregulation entscheidet über die Induktion der Expression und damit über den essentiellen Schritt der Proteinsynthese. Die Interaktion der aktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktoren mit einem Gen reguliert somit die zell- und gewebespezifische Expression von Proteinen. Die konstitutive Expression von Genen wird durch äußere Stimuli verändert. Extrazelluläre Signale werden bei der Signaltransduktion einer Zelle in intrazelluläre Signale umgewandelt, welche letztlich in den Zellkern gelangen und dort das konstitutive Transkriptionsmuster von Genen verändern. Voraussetzung für die Transkription ist die Bindung der ubiquitär oder zellspezifisch vorkommenden Transkriptionsfaktoren an die DNA.

Die Kenntnis der Wechselwirkung und der Kontrollregulation führt zum Verständnis der Proteinfunktion innerhalb der Zelle, innerhalb des Gewebes, innerhalb des Organismus und somit zum Verständnis des komplexen Organismus selbst.

1.2 Die Regulation der β -Zellen des Pankreas

1.2.1 Die Regulation der β -Zellen des Pankreas durch Glukose

Funktionen der β -Zellen

Die Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), welche sich mit 1 bis 2% als ein geringer Anteil des vorwiegend exokrinen Bauchspeicheldrüsengewebes darstellen, sind endokrine Drüsen, die durch Hormonsezernierung der beiden Schlüsselhormone des Kohlenhydratstoffwechsels, Insulin und Glukagon, den Metabolismus für zahlreiche Organe koordiniert – mit dem Ziel der optimalen Aufnahme, Speicherung und Verwertung der Nährstoffe für den gesamten Körper. Um dieses Ziel zu erreichen, adaptieren die β -Zellen des Pankreas, welche speziell auf die Insulin-Biosynthese und -Sekretion ausgerichtet sind, fortwährend ihre Insulinsekretion an das zirkulierende Nährstoffangebot und multifaktorielle Signale durch Hormone (z. B. Glukagon, GLP-1), Wachstumsfaktoren und Transmitter (z. B.

Adrenalin, Acetylcholin), (Glauser & Schlegel, 2007). Insulin sorgt für eine ausgeglichene Versorgung der Körperzellen mit Glukose und regelt die Blutglukosekonzentration: Es ist das einzige Hormon, das den Blutzuckerspiegel senken kann.

Warum wurde das Augenmerk der Forschung in den letzten Jahren verstärkt auf die Insulinregulation gerichtet? Störungen innerhalb der Regulationsmechanismen führen zu Veränderungen des Glukosespiegels und schließlich einer Insulinresistenz. Die pankreatischen β -Zellen können kurzfristig durch Zell-Vergrößerung (Hypertrophie) (Bonner-Weir et al., 1989) und Steigerung der Insulinsekretion (Parsons et al., 1992) den Blutglukosespiegel zunächst im Normbereich halten. Ist diese kompensatorische Leistung der β -Zellen nicht mehr ausreichend, kommt es zu einer Hyperglykämie mit schwerwiegenden Schädigungen und Folgeerkrankungen wie *Diabetes mellitus*. Als zunehmende Volkskrankheit mit knapp 6% (definitionsgemäß laut WHO) stellt *Diabetes mellitus* (Typ 2) ein enormes medizinisches Problem dar, weshalb die Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten von großem Interesse ist.

Die grundlegenden Kenntnisse der Glukose-induzierten Signaltransduktion sind dafür die notwendige Voraussetzung, welche die vorliegende Arbeit weiter aufklären soll.

Glukose-induzierte Regulation der Transkription

Glukose reguliert in den pankreatischen β -Zellen die Insulin-Sekretion sowie die Insulin-Synthese auf transkriptioneller Ebene. Glukose induziert einen Ca^{2+} -Einstrom, der in Folge eine Vielzahl an Signalwegen initiiert (Bernal-Mizrachi et al., 2010). Die schnelle Aufnahme von Glukose in die Zellen findet über den Glukosetransporter GLUT2 statt. In der Zelle wird Glukose mittels der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt und schließlich in Mitochondrien zu CO_2 und H_2O oxidiert, wobei das dabei entstehende ATP dazu führt, dass ATP-abhängige Kanäle sich schließen, Kalium sich in der Zelle sammelt und eine Membranpotentialänderung (von -65 auf -33 mV) hervorruft (Cook & Hales, 1984). Die Depolarisation wiederum führt zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, wodurch extrazelluläres Ca^{2+} in die Zelle eintritt und als *second messenger* eine intrazelluläre Signalkaskade induziert. Diese Kaskade hat einerseits kurzfristige Auswirkungen zur Folge: Das in Vesikel gespeicherte Insulin wird durch die Ca^{2+} -induzierte Exocytose ins Blut ausgeschüttet (Abbildung 1). Die Folge ist eine Senkung des Blutzuckerspiegels durch Förderung der Glukoseaufnahme und -speicherung (Glykogensynthese).

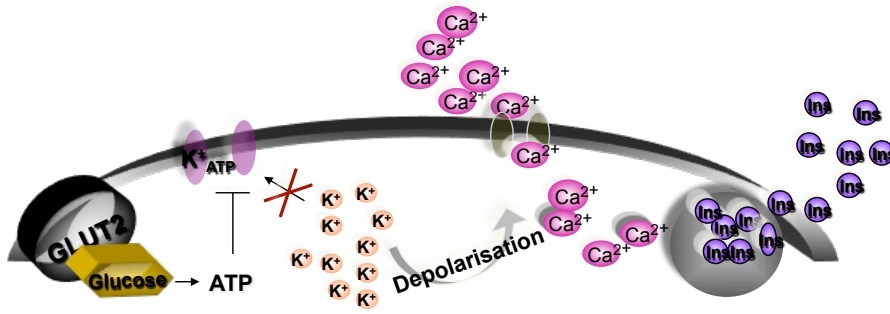


Abbildung 1: Aufnahme von Glukose in die Zelle und die Folgereaktionen

Schematische Darstellung der Glukoseaufnahme in die Zellen via Glukosetransporter GLUT2. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat verstoffwechselt. Das entstehende ATP führt dazu, dass ATP-abhängige Kanäle sich schließen und die folgende Depolarisation zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führt. Das in Vesikel gespeicherte Insulin wird durch die Ca^{2+} -induzierte Exocytose ins Blut zur Glukosesenkung ausgeschüttet.

Darüberhinaus ruft die Glukose-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration langfristige Änderungen hervor, die sich durch eine adaptierende Genexpression manifestiert. Wie wirkt Glukose auf das Transkriptionsmuster der β -Zellen ein? Die Erhöhung der Ca^{2+} -Ionen im Zytosol aktiviert verschiedene intrazelluläre Transduktionssignale wie Calmodulin-Kinasen, die Proteinkinase C (PKC), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), sowie die „extrazellulär signal-regulierte Kinase 1/2“ (ERK1/2) (Abbildung 2) (Ahren, 2000).

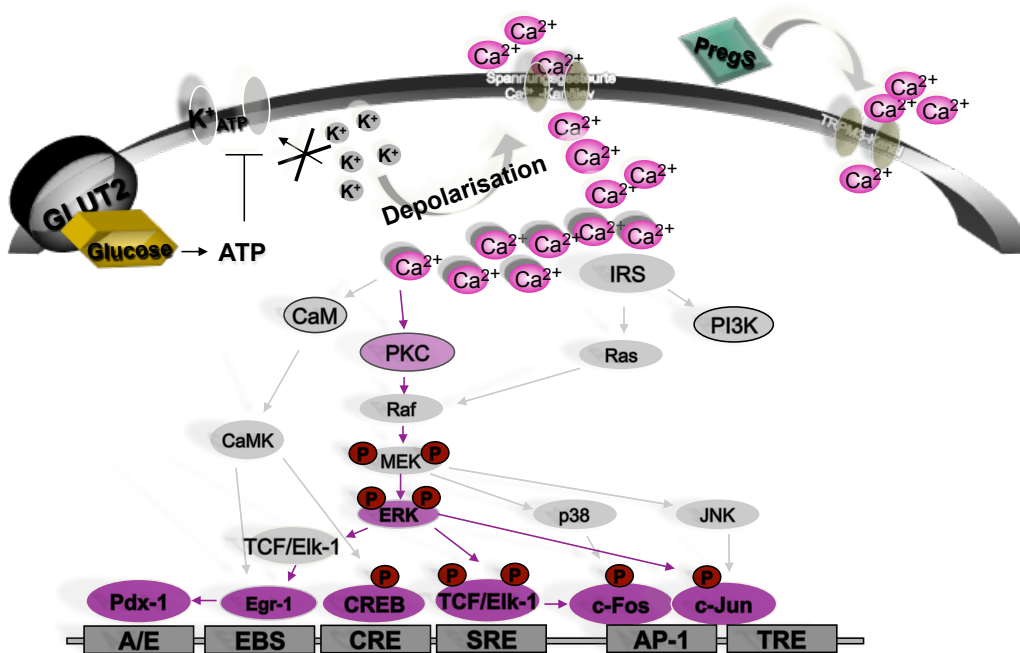


Abbildung 2: Vereinfacht-dargestellte Ca^{2+} -induzierte Signaltransduktion

Ca^{2+} kann als *second messenger* durch verschiedene Signale aktiviert werden und kann seinerseits verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Ca^{2+} -aktivierte Transkriptionsfaktoren regulieren im Weiteren Verlauf des Signalwegs die Transkription. CaMK= Calmodulin-/Kinase; PLC= Phospholipase C; PKC= Phosphokinase C; PI3K= Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase; cAMP= zyklisches AMP; IRS= Insulin-Rezeptor-Substrat; CREB= CRE binding element; PregS= Pregnenolonsulfat. Weitere Abkürzungen im Text.

Solche Signalkaskaden führen zur Aktivierung bzw. Hemmung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Abbildung 2) und resultieren in einer veränderten Genexpression. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die spezifisch in der Promotorregion von Genen binden und deren Transkription aktivieren oder hemmen. Zusätzlich zur Verfügbarkeit der DNA-Bindung benötigen manche Transkriptionsfaktoren zur Aktivität eine posttranslationale Modifikation, z. B. Phosphorylierung oder Bindung von Cofaktoren (Sanchez & Sharma, 2009).

Glukose-sensitive Transkriptionsfaktoren

Mehrere Transkriptionsfaktoren, die in Glukose-stimulierten β -Zellen aktiviert sind, wurden identifiziert. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf die Untersuchung der basischen Leucin-Zipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren (Wang et al., 2008), (Glauser & Schlegel, 2007), des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein 1 (AP-1) (Glauser et al., 2006) und des Transkriptionsfaktors Egr-1 (Frödin et al., 1995), (Josefsen et al., 1999), (Bernal-Mizrachi et al., 2000), (Mayer & Thiel, 2009) sowie Elk-1 (Bernal-Mizrachi et al., 2001), (Mayer & Thiel, 2009).

Basische Leucinzipper (bZIP) -Transkriptionsfaktoren

Das Aktivator-Protein 1 (AP-1) wurde in der Literatur ursprünglich als Heterodimer der basischen Leucinzipper (bZIP) c-Fos und c-Jun beschrieben (Chiu et al., 1988). Die Mitglieder der bZIP-Familie wie CREB, c-Jun sowie c-Fos dimerisieren über ihren Leucin-Zipper und bilden dadurch Domänen aus, die ihre basischen Domänen befähigt auf sequenz-spezifische Weise an die DNA zu binden (Abbildung 3). Die bZIP-Domäne, auch Leucin-Zipper genannt, ist eine Proteindomäne, die man in vielen eukaryotischen DNA-Bindeproteinen findet und besteht aus einer Alpha-Helix, bei der jede siebte Aminosäure - oftmals eben ein Leucin - hydrophob ist und auf einer Seite der Helix zu liegen kommt. Treten diese Domänen von zwei Proteinen in Kontakt, können sich sowohl Homo- als auch Hetero-Dimere bilden. Leucine der α -Helix lagern sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zusammen und es kommt zur Bildung einer linksgängigen Super-Helix. Charakteristisch ist die Gabelbildung. Diese bildet sich aufgrund der positiv geladenen, basischen Aminosäuren wie Arginin sowie Lysin aus und ermöglicht eine Bindung an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA. BZIP-Proteine bilden eine der größten Familien von Transkriptionsfaktoren in eukaryotischen Zellen. Ihnen ist eine Schlüsselrolle bei der Regulation wesentlicher Funktionen wie u. a. Zellzyklus, Immunantwort, Blutbildung und Knochenentwicklung nachgewiesen.

Den bZIP-Proteinen wurde auch eine Funktion in den β -Zellen des Pankreas zugesprochen. Durch Stimulierung mit Glukose wird das b-ZIP Protein CREB (Mayer & Thiel, 2009) in Insulinoma-Zellen phosphoryliert. CREB wird zum Überleben der β -Zellen aufgrund der Aktivierung der CRE-regulierten Gene (Thiel et al., 2005) wie z. B. IRS-2 benötigt (Inada et al., 2004), (Jhala et al., 2003). Die Glukose-induzierte Expression von c-Fos (Glauser et al., 2006) in Insulinoma-Zellen deutet zusätzlich auf eine regulatorische Rolle der bZIPs in den β -Zellen hin.



Abbildung 3: Basische Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktoren

Eine bZIP-Domäne besteht aus einer Alpha-Helix, bei der jede siebte Aminosäure hydrophob ist und auf einer Seite der Helix zu liegen kommt. Leucine der α -Helix lagern sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zusammen und dies begünstigt die Bildung einer linksgängigen Super-Helix. Die Gabelbildung bildet sich aufgrund der positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin und Lysin aus und ermöglicht eine Bindung an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA. Abbildung aus Alberts et al. (2002).

Egr-1-Transkriptionsfaktor

Die Familie der Egr-Proteine umfasst die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Egr-1, Egr-2, Egr-3 und Egr-4. Sie besitzen homologe DNA-Bindungsdomänen und binden mit ihrer Zinkfingerdomäne aus drei Zinkfinger des Cys₂His₂-Typs an GC-reiche Zielsequenzen. Das DNA-Konsensus-Motiv mit der Sequenz GCG(G/T)GGGCG wird auch als EBS (Egr-Bindungssequenz) bezeichnet (Christy & Nathans, 1989). Bei der Zinkfingerdomäne handelt es sich um eine Proteindomäne, bei der ein Zink-Ion koordinativ gebunden ist und dadurch eine schleifenförmige Struktur – der sogenannte Zinkfinger – entsteht. Sie besteht aus einer α -Helix und einer antiparallelen β -Faltblatt-Struktur (Abbildung 4). Das Egr-1-Gen wurde in Fibroblasten entdeckt (Sukhatme et al., 1988), die nach einer Hungerperiode erneut zur Proliferation angeregt wurden. Daher stammt die Benennung *early growth response*. Die biologische Aktivität von Egr-1 wurde seither mit einem genetischen Programm korreliert, das die Zell-Proliferation steuert. Zu weiteren Funktionen von Egr-1 zählen die Regulation der synaptischen Plastizität im Nervensystem (Jones et al., 2001), die Reproduktion (Lee et al., 1996) und die Vermittlung der Immunantwort (McMahon & Monroe, 1996).

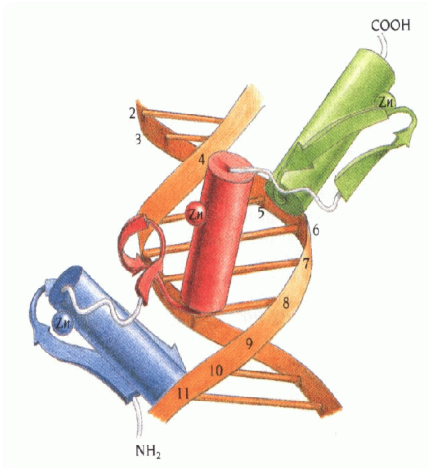


Abbildung 4: Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren

Proteine der Egr-Familie besitzen als gemeinsames Strukturmotiv drei Zinkfinger des Cys₂His₂-Typs. Sie sind als Triplet angeordnet und bilden die DNA-Bindungsdomäne. Jede Zinkfingerdomäne besteht aus einem antiparallelen β-Faltblatt und einer α-Helix. Das zentrale Zink-Ion wird von je zwei Histidin- und Cystein-Resten koordinativ gebunden. Die drei Zinkfinger sind in einer semizirkulären Struktur arrangiert, die sich in die große Furche der B-DNA einfügt.

Im endokrinen Pankreas wird die Egr-1 Biosynthese nach Stimulation mit Glukose stark hochreguliert (Josefsen et al., 1999), (Bernal-Mizrachi et al., 2000).

Egr-1 induziert indirekt die Transkription des Insulin-Gens, indem es an den Pdx-1-Promotor bindet und die Pdx-1-Transkription stimuliert (Eto et al., 2007).

Elk-1-Transkriptionsfaktor

Elk-1, *E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*, gehört zur Gruppe der *ternary complex factors* (TCF), die zusammen mit einem *serum-response factor* (SRF)-Dimer einen ternären Nukleoproteinkomplex bilden. In Säugetieren gibt es drei TCFs: Elk-1, SAP-1 und SAP-2. Die ETS-Domäne ist eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne, welche durch eine geflügelte *helix-turn-helix*-Struktur charakterisiert ist. Sie bindet mit der zentralen GGA-Sequenz an die DNA (Abbildung 5). Elk-1 spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Vorgängen wie der Langzeit-Gedächtnisbildung, der Drogensucht, der Alzheimer-Krankheit, dem Down-Syndrom, Brustkrebs und Depression. Die transkriptionelle Aktivität der TCFs wird über Kinasen via Proteinphosphorylierung reguliert, d. h. intrazelluläre Signalwege können im Zellkern durch die Aktivierung der TCFs in eine veränderte Genregulation übersetzt werden. So wird u. a. die Glukose-induzierte Expression von Egr-1 nach Stimulation über fünf *serum response elemente* (SRE) im Egr-1-Promotor reguliert (Thiel & Cibelli, 2002), (Rössler et al., 2006). In MIN6 Insulinoma-Zellen wurde die Phosphorylierung von Elk-1 durch Glukose induziert (Bernal-Mizrachi et al., 2001), (Mayer & Thiel, 2009).



Abbildung 5: Ternäre Komplex aus Elk-1 und SRF

Schematische Darstellung des Nukleoproteinkomplex aus dem Transkriptionsfaktor Elk-1 und *serum-response factor* (SRF)-Dimer. Elk-1 bindet mit zentraler GGA-Sequenz an die Ets-DNA-Sequenz und befähigt zusammen mit den SRF, das SRE-Element zu aktivieren.

1.2.2 Second messenger Calcium als Teil der Signalkaskade

Die (R)Evolution hin zu einem Zellsystem erforderte die Adaption an die Umwelt. Um auf Veränderungen der Umwelt reagieren zu können, bildeten sich zur Signalvermittlung sogenannte *second messenger* wie Ca^{2+} heraus, deren Konzentration mit der Zeit variiert. Zellen empfangen viele externe Signale durch Rezeptoren für Hormone, für Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Temperatur, Druck, Klang, Licht usw. sowie die β -Zellen durch Glukose. Die Zelle konvertiert die Nachricht des Rezeptors durch präzise Steuerung von Ca^{2+} -Kanäle in Ca^{2+} -Signale. Das divalente Kation Calcium (Ca^{2+}) hat durch seine Rolle als sekundärer Botenstoff auf viele physiologische wie biochemische Prozesse des zellulären Lebens einen Einfluss. Hierzu zählen Exozytose, Bewegung, Apoptose, Transkription und Reizweiterleitung (Clapham, 2007). Ca^{2+} ist daher einer der grundlegendsten Signalstoffe in allen tierischen Zellen und wirkt als Bindeglied in der Glukose-induzierten Signalkaskade in den β -Zellen. Eine leichte Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} genügt, um schnelle zelluläre Antworten wie die Kontraktion, Sekretion

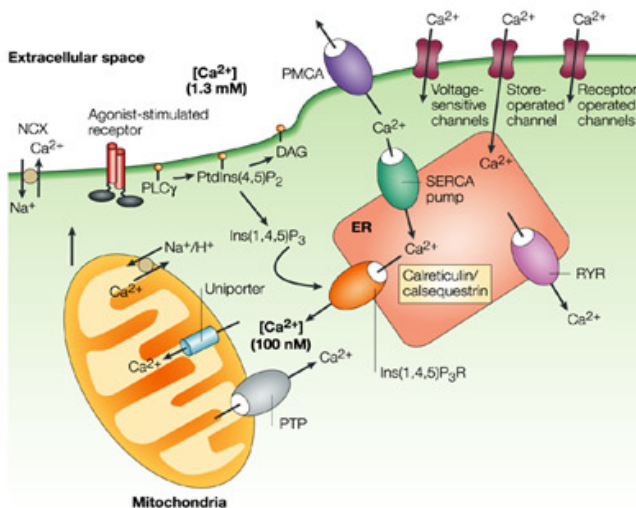


Abbildung 6: Calcium

Zelluläres Ca^{2+} tritt durch Rezeptor-gesteuerte, spannungsgesteuerte oder Speicher-regulierte Kanäle in die Zelle ein. In der Zelle kann Ca^{2+} mit Ca^{2+} -Bindeteinen interagieren oder im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Mitochondrium gespeichert werden. Ca^{2+} -Konzentrationen werden durch zahlreiche Pumpen, Rezeptoren sowie durch Ca^{2+} -Bindeteine beeinflusst. DAG, diacylglyceride. Abbildung aus Orrenius et al. (2003).

oder eine metabolische Enzymaktivität auszulösen. Die Effektivität und Geschwindigkeit des Signals basieren auf dem ca. 20.000-fachem Gradienten, der durch Kompartimentierung und Chelatierung aufrecht erhalten wird (Clapham, 2007) (Abbildung 6). Zellspezifische Ca^{2+} -Pumpen und -Kanäle in der Plasmamembran und den Membranen der Kompartimente bilden das Gerüst für die Signalbildung sowie -änderung. Ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen via spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs ist ein häufig genutzter Mechanismus in den β -Zellen des Pankreas zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Chelatierung von Ca^{2+} dient der Zelle zusätzlich zur Regulation des

Ca^{2+} -Signals. Die Bindung von Ca^{2+} resultiert in einer Konformations- und Ladungsänderung der Chelatbildner, welche sich direkt auf die Lokalisation, Bindung sowie Funktion derer

auswirkt. Calmodulin zum Beispiel begünstigt nach Ca^{2+} -Bindung die Dimerisierung von Proteinen.

Die Zelle verwendet Zellkompartimente, wie das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien als Ca^{2+} -Speicher (Meldolesi & Pozzan, 1998). Die gezielte Ca^{2+} -Freisetzung an verschiedenen Stellen dient der weiteren Kontrolle wie z. B. der intervesikulären Fusion oder der Wachstumszonenbildung. Welche Bedeutung haben die Ca^{2+} -Mikrodomänen für die Regulation der Gentranskription? Widersprüchliche Ergebnisse sind diesbezüglich in der Literatur zu finden und sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit: Verstärken erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen im Zellkern die Transkription CRE-regulierter Gene, während zytoplasmatische Ca^{2+} -Ionen die SRE-regulierte Genexpression begünstigen? Für alle Zellen gilt: Zu niedrige wie zu hohe Ca^{2+} -Konzentrationen sind unvereinbar mit dem Überleben der Zellen und zwischen diesen Extremen übernimmt die Ca^{2+} -Konzentration schützende und physiologische Aufgaben in einer Zelle (Bernal-Mizrachi et al., 2010).

1.3 Zielsetzung

Das Verständnis der physiologischen und biochemischen Regulation von β -Zellen ist von akutem Interesse. Die molekularen Mechanismen und beteiligten Faktoren, welche der Glukose-induzierten Genexpression unterliegen, sind nur nicht vollständig geklärt. Aufgrund dessen ist das Ziel dieser Arbeit, ein spezifischeres Profil der Signaltransduktion, der Genexpression sowie der beteiligten Transkriptionsfaktoren *in vivo* und *in vitro* in den β -Zellen des Pankreas zu erstellen.

Dabei ergeben sich folgende vier Aufgabenfelder:

1. Analyse von Glukose-aktivierten Transkriptionsfaktoren in INS-1-Zellen

Eine *Micro-Array*-Studie identifizierte den Transkriptionsfaktor AP-1 als Glukose/cAMP-stimulierten Transkriptionsfaktor (Glauser et al., 2006). Das Postulat, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 bei der Glukose-induzierten Signalkaskade in Insulinoma-Zellen aktiviert wird und letztendlich für eine Änderung der Genexpression mitverantwortlich ist, sollte am Modell der Insulinoma-Zelllinie INS-1 untersucht werden.

2. Untersuchungen von Ca^{2+} -Mikrodomänen als Regulationsmechanismus der Glukose-induzierten Genexpression in INS-1 Zellen

Für Neuronen wurde postuliert, dass nukleares Ca^{2+} die CRE-abhängige Transkription und zytoplasmatisches Ca^{2+} die SRE-vermittelte Transkription steuert (Hardingham et al., 2001). Es stellte sich die Frage, ob diese Hypothese auch für Insulinoma-Zellen zutrifft. Die Expression von Ca^{2+} -puffernden Proteinen im Zytosol, im Kern oder im ER sollten den Einfluss der Ca^{2+} -Mikrodomänen bei der Gentranskription klarstellen.

3. Analyse von Pregnenolonsulfat-aktivierten Transkriptionsfaktoren in INS-1-Zellen

Die molekulare Zellbiologie der β -Zellen zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeit mit der von Neuronen. Signalmoleküle wie das Steroid Pregnenolonsulfat induzieren in den β -Zellen einen Ca^{2+} -Einstrom. In diesem Zusammenhang sollte aufgrund der Ca^{2+} -Abhängigkeit die Genexpression nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat in INS-1-Zellen untersucht werden.

4. Analyse zur Bedeutung von Egr-Transkriptionsfaktoren in β -Zellen *in vivo*

Zellkultur-Daten deuten darauf hin, dass Egr-1 die Expression von Pdx1, dem Hauptregulator der Insulinexpression, reguliert (Eto et al., 2007), (Mayer et al., 2011). Die Hypothese, dass Egr-1 eine Auswirkung auf die Biosynthese von Insulin und weitere β -Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose oder Angiogenese hat, sollte in einem Tiermodell überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop (Stemi2000)	Zeiss, Göttingen
Autoklav	Schütt, Göttingen
Behälter für Flüssigstickstoff	diverse Hersteller
Blotting Kammer mit Zubehör	Hoefer Scientific Instruments, CA, USA
Brutschränke	diverse Hersteller
BX 60-Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
BZ-8000- Mikroskop	Keyence, Osaka, Japan
Eismaschine	diverse Hersteller
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, Werkstadt Biochemie Homburg
Entwicklermaschine Gevamic 60 für Röntgenfilme	Agfa-Gevaert, München
Exposure Cassette mit Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, GE Healthcare, Freiburg
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Bio-Rad , München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, München
Luminometer	Berthold Detection Systems,Alabama, USA
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
Mikroprocessor pH-Meter pH537	WTW, Weilheim,
Mikroskop (Durchlicht) Axiovert25	Zeiss, Göttingen
Mikrotoms Leica SM2000R	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrowellenherd	AEG, Nürnberg
Milliporewasser-Anlage Milli Q	Millipore, Milford, USA
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer improved	Roth, Karlsruhe
PCR-Cycler Labcycler	Sensoquest, Göttingen
pH-Meter, inoLab pH 720	WTW, Weilheim
Phosphorimager SF	Molecular Dynamics, GE Healthcare, Freiburg
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, NJ, USA
Pipetten (20µl, 200µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
	Abimed, Langenfeld;
	Gilson, Middleton, USA
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Rotator	Faust GmbH, Köln
Rotoren für Kühlzentrifuge J2-HS: JA.10	Beckman, München

(max. 17.700x g) und JA.20 (max. 48.800x g)	
RT-PCR-Gerät Mx3000P	Stratagene, CA, USA
Spannungsgeräte für Agarosegel-Elektrophorese: APELEX PS 503, für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Sterilbank	
Tischzentrifuge: Biofuge [®] pico	Heraeus, Hanau
TissueTek (Jung Einbettmedium)	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät mit Micro-und Macrotip	Leica, Nussloch
UV-Tisch	Branson, Danbury, USA
Vortex-Mixer	Fröbel, Wasserburg
Wasserbäder, temperierbar	IKA Labortechnik, Staufen
Western Blot-Apparatur: Mini Trans-Blot Cell	diverse Hersteller
Wipptische	Bio-Rad, München
Zentrifuge: Centrifuge 5810R	Biometra, Göttingen
	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

3MM-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser 24 x 24 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettkassette mit Deckel	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmal-Impfösen: Inoculating Loop, steril	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Einmal-Spitzen	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen Injekt (10 ml, 20 ml)	Braun Melsungen AG, Nürtingen
Filterpapier DE81	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtersäulen, 1 ml	Quiagen, Hilden
Glucometer und Kontrollstreifen	Accu-Chek®, Aviva, Roche, Mannheim
Inkubationsröhrchen 12 ml	Greiner & Söhne, Nürtingen
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Küvetten UVette, 50-2000µl	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulose Membran Trans-Blot Transfer Medium, 0,2 µm	Bio-Rad, München
	Pall Gelman Laboratory, Pensacola, Mexiko
Objekträger 76 x 26 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objekträger, ca. 76 x 26 mm, gebrauchsfertig	Menzel GmbH & Co. KG,
PCR-Reaktionsgefäße	Thermo Scientific, Karlsruhe
Petrischalen 120 mm	Sarstedt, Nürnberg
Pflaster, Leukosilk [®] 10 mm	Beiersdorf AG, Hamburg
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen): 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Platten 60 mm	Sarstedt, Nürnberg
Polystyren-Röhrchen	Becton Dickensen, Heidelberg
Quiagen-tip 500 Säule	Quiagen, Hilden
Reaktionsgefäße: 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Fuji-Film, Düsseldorf
Sartolap P Druckfiltrationseinheit steril	Sartorius, Göttingen

Sterilfilter: 0,2 µm, 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfiltrationseinheiten: Bottle Top-Filter, 150 ml, 500 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman 3MM-Papier	Whatman, Maidstone, UK
Wattestäbchen (kleiner Kopf), unsteril	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Quarzglas-Kanüle, Microfil 34 AWG	WPI, Florida, USA (# MF34G-5)
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen,
Zellkulturschalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen-Röhrchen 15 ml	Greiner & Söhne, Nürtingen

2.1.3 Chemikalien und Feinchemikalien

100bp DNA Ladder plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# SM0323)
5-Bromo- 2'-Deoxyuridin (BrdU)	Calbiochem, Mannheim (# 20386)
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (# 4227.1)
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma, Steinheim (# I5879)
3-N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamino-propansulfonsäure Natriumsalz	Roth, Karlsruhe (# 4855.2)
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich, Steinheim (# H7904)
6x Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# RO411)
Acrylamid, Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe (# 3029.1)
Agar	Merck, Darmstadt (# 1615)
Agarose-Tabletten Roti®agarose	Roth, Karlsruhe (# HP67.3)
Ammersham ECL Plus Western-Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (# 2132.2133)
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe (# 9178.1)
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe (# K029.2)
BCA Protein Kit	Pierce, Rockford, USA (# 23225)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg (# 15375.02)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München (# 85040C)
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe (# T885.1)
Chelat-100	Biorad, München (# 1432832)
Chloroform	Roth, Karlsruhe (# 6340.1)
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München (# C6628)
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Steinheim (# A2056)
Complete® Protease Inhibitor	Roche, Mannheim (# 11873580001)
dATP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0141)
dCTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0151)
dGTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0161)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe (# A994.1)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt (# 6580)
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe (# 6908.1)
DME	Sigma-Aldrich, München (# D5030)
DMEM	Sigma-Aldrich, München (# D5523-10L)
Doxycyclin	Biomol, Hamburg (# LKT-D5898.25)
DPBS	Gibco, Invitrogen, CA, USA (# 14200-075)

dTTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (# R0171)
EDTA	Roth, Karlsruhe (# CN06.1)
Ethanol	VWR, Fontenay sous Bois, FR (#
Ethidumbromid	Roth, Karlsruhe (# 7870.1)
<i>Fetal Calf Serum</i>	Biochrom AG, Berlin (# S0115)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt (# 344198)
Formaldehyd 4%	Roth, Karlsruhe (# 4980.2)
Formamid	AppliChem, Darmstadt (# A2156)
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden (# 344270)
FPL 64176	Santa Cruz, Heidelberg (#sc-201491)
Genectin 418 Sulfat	Calbiochem, Bad Soden (# 345810)
Glycerol	Biomol, Hamburg (# 50405)
Glycin	Roth, Karlsruhe (# 3790.1)
D-Glukose	Merck, Darmstadt (# 25972)
Glykogen	MBI Fermentas, St.Leon-Rot (# R0561)
Hämalaun	Merck, Darmstadt (# 109249)
HBSS	Gibco, Invitrogen, CA, USA (#14025)
HCl	Roth, Karlsruhe (# 9277.1)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe (# 2363.4)
HepatoQuick	Roche, Mannheim (# 27305)
IBMX	Sigma-Aldrich, Steinheim (# 15879)
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe (# CP41.1)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St.Leon-Rot (# R0391)
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe (# T874.2)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe (# 6781.1)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (# 4873)
Calciumdichlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe (# 5239.1)
Kollagenase P	Roche, Mannheim (# 11 213 857 001)
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories, Pasching (# M11004)
Luminol	Roth, Karlsruhe (# 4203.2)
Luziferin	Sigma-Aldrich, München (#
Lysozym	Roth, Karlsruhe (# 8259.2)
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St.Leon-Rot (# EP0441)
Magermilchpulver (Slim Fast)	Allpharm-Vertrieb GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt (# 5833.0250)
Methanol	Roth, Karlsruhe (# 4627.2)
Molekulargewichtsmarker	Fermentas, St.Leon-Rot (# SM0321)
N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N' (2-ethanesulfonic acid) (HEPES)	Roth, Karlsruhe (# 9105.4)
N,2'-O-Dibuteryladenosine-3':5'-cyclic Monophosphate (dbcAMP)	Sigma, Steinheim (# D0627)
N,N-Dimethylfomamid	Roth, Karlsruhe (# T921.1)
Natriumacetat-Trihydrat z.A.	Merck, Darmstadt (# 1.06267.1000)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (# 3957.2)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt (# 137018)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe (# 2326.2)
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe (# 8551.2)
Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt (# 6575)

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt (# 106467)
Natriumpyruvat	Invitrogen, CA, USA (# 11360070)
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim, (# N6264)
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Steinheim (# N7634)
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim (# 74385)
PD 98059	Axxora, Lörrach (# 50888)
Paraffin Granopent® „P“	Roth, Karlsruhe (# 9279.1)
Penicillin/Streptomycin (100x) (P/S)	PAA, Marburg (# P11010)
Pepton	Roth, Karlsruhe (# 8986.2)
Phenol	Roth, Karlsruhe (# 0040.2)
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P7626)
Pregnenolonsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim (#P162)
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P8783)
Pregnenolon	Sigma-Aldrich, Steinheim (# P9129)
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim (# 107689)
Ponceau-S-Lösung (1%)	Roth, Karlsruhe (# 27195)
Primer	Sigma-Genosys, Steinheim
Proteinmarker	Fermentas, St.Leon-Rot (# SM 0441)
Puromycin	PAA, Marburg (# P11019)
Radioisotope	Firma Amersham Buchler, Braunschweig
Random-Hexamer Primer	Fermentas, St.Leon (# SO142)
Reporter Lysis Buffer	Promega, Mannheim (# E3971)
Ribonuklease Inhibitoren	Fermentas, St.Leon-Rot (# EO0381)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (# 3029.1)
RPMI 1640	PAA, Marburg (#G0029,3050)
Salzsäure(HCl) rauchend 37%	Roth, Karlsruhe (# 4625.2)
SB203580 p38 protein kinase inhibitor	Alexis (Lörrach, # 270179M001)
Sukrose (+D)	AppliChem, Darmstadt (# A2211)
Taq-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot (# EP0401)
TEMED	Roth, Karlsruhe (# 2367.2)
TPA	Sigma, Steinheim (# P1585)
Tetrazyklin	Fluka, Neu Ulm (# 87128)
Trichlormethan / Chloroform	Roth, Karlsruhe (# 3313.1)
Tris	Roth, Karlsruhe (# 5429.2)
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Marburg (# L11003)
Tween20	Roth, Karlsruhe (# 9127.1)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)	Roche, Mannheim (# 10745740001)
Xylol	Roth, Karlsruhe (# 9713.2)

2.1.4 Enzyme und Puffer

1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen	Sigma, Steinheim (# H9268)
Chloroquin (Diphosphat-Salz)	Sigma, Steinheim (# C6628)
Klenow Enzym, T4-Ligase, T4-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen, passende Puffer,	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme mit passenden Puffern	New England BioLabs, Frankfurt
RNase A	Fluka, Neu Ulm (# 83832)

2.1.5 Kits

Amersham ECLplus	GE Healthcare, München (# RPN2132)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe (# 23225)
ELISA Rat/Mouse Insulin ELISA	Millipore, MA, USA (# EZRMI-13K)
Qiagen RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen, CA, USA (# 74034)
Caspase-Glo 3/7 Assay Kit	Promega, Mannheim, (# G8090)
Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, CA, USA (# 200521)

2.1.6 E.coli-Stämme

Zur Transformation wurden die *E.coli* -Stämme XL-1 Blue und Dh5 α verwendet. Zur Transformation nach der Mutagenese wurden die mit dem „Quickchange II XLTM Site-Directed Mutagenesis Kit“ gelieferten *E.coli* XL10-Gold ultrakompetenten Zellen verwendet.

2.1.7 Plasmide und Vektoren

Für die Herstellung der rekombinanten Lentiviren wurden drei Plasmide benötigt. Ein Verpackungsplasmid, das für die Strukturgene gag, pol und rev kodierte, ein Expressionsplasmid, das für die Hüllproteine/ Glykoproteine kodierte und ein Transferplasmid, das für das einzubringende Transgen kodierte (Thiel & Rössler, 2007).

Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und besitzen die Fähigkeit, teilungsfähige sowie auch postmitotische Zellen infizieren zu können. Lentiviren stellen somit optimale Vehikel für den Transfer von Genen dar. Deren Genom umfasst nur etwa 10.000 Basenpaare und lässt sich in drei Genbereiche aufteilen: gag (*group-specific antigen*; kodiert für den Proteinmantel des Virus), pol (*polymerase*; kodiert für die virale Polymerase) und env (*envelope*; kodiert für das Hüllprotein). Weitere vorhandene akzessorische Gene sind für die Replikation aber nicht essentiell. Die LTRs (*long terminal repeats*) sind repetitive DNA-Sequenzen, die sich am 5`- und am 3`-Ende der Nukleinsäure von Viren befinden und als Schutz der revers transkribierten DNA vor hydrolytischem Abbau dienen und die Integration in das Wirtsgenom fördern. Das am 5`-Ende der Nukleinsäure befindliche Repeat agiert als starker Promotor zur Transkription viraler Gene. Das Verpackungssignal ψ sorgt dafür, dass das retrovirale Genom in einen Proteinmantel gehüllt wird. Um den sehr eingeschränkten Tropismus des HI-Virus zu umgehen und die Spezifität des Virus zu erweitern, wurden die lentiviralen Vektoren mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert (Burns et al., 1993), (Naldini et al., 1996).

2.1.7.1 Verpackungs- und Expressionsplasmide zur Generierung infektiöser Viren

Δ8.91

Dieses Verpackungsplasmid kodiert für die viralen Proteine gag, pol und rev, welche durch den starken *Immediate Early* (IE)-Promotor/Enhancer des *Cytomegalo-Virus* (CMV) bzw. das Polyadenylierungssignal des *Simian-Virus 40* (SV40) flankiert sind (Abbildung 7).

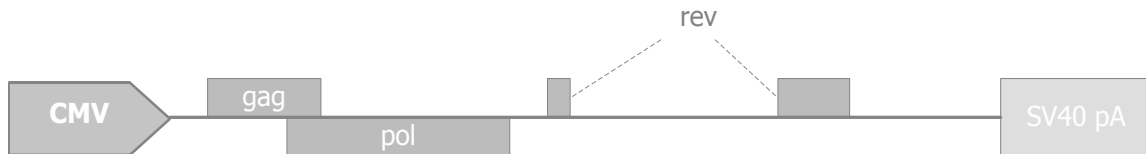


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids Δ8.91

Der Vektor Δ8.91 enthält die Kodierungsregion für die viralen Proteine gag, pol und rev unter der Kontrolle des *Immediate Early* (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV). Das Plasmid verfügt über das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) (Thiel & Rössler, 2007).

pCMV-G

Dieses Expressionsplasmid kodiert für das virale Hüllprotein des *Vesicular Stomatitis-Virus* (VSV) unter der Kontrolle des starken *Immediate Early* (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV). Das Expressionsplasmid besitzt das 3' Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) (Abbildung 8).



Abbildung 8: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pCMV-G

In den Vektor wurde die Kodierungsregion für das virale Hüllprotein des VSV unter der Kontrolle des *Immediate Early* (IE)-Promotor/Enhancers des Cytomegalo-Virus (CMV) einkloniert. Das Plasmid verfügt über das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) (Thiel & Rössler, 2007).

2.1.7.2 Lentivirale Expressionsplasmide

Das Transferplasmid kodiert für das einzubringende Transgen unter Kontrolle eines internen Promotors. Ein Transferplasmid besitzt das Verpackungssignal ψ , damit die hergestellte virale RNA in die Hüllproteine transportiert wird. Des Weiteren verfügt das Plasmid über das WPRE (*Woodchuck Postranscriptional Regulatory Element*), welches die Stabilität des Transkripts erhöht (Zufferey et al., 1999) und über das *HIV-flap*-Element, welches den Kerntransport der Virus-DNA erhöht (Sirven et al., 2000).

Alle nachfolgenden Transferplasmide (Tabelle 1) sind Abwandlungen des pFUGW-Plasmids (Abbildung 9), das unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors steht (Lois et al., 2002). Der Transfervektor bestand aus zwei LTR Regionen des HIV-Genoms mit einer 3'- Δ U3-Mutation, einem *HIV-flap* und einem WPRE. Durch die Δ U3-Mutation des 3'LTR- resultieren nach der

reversen Transkription unvollständige, transkriptionell-inaktive LTR-Sequenzen. Die Viren sind somit selbst-inaktivierend.

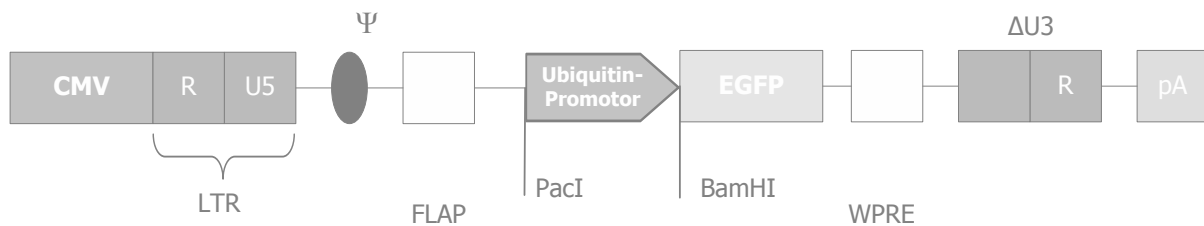


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Plasmids pFUGW

Gezeigt sind die LTRs mit einer $\Delta U3$ -Mutation, der HIV-flap, das WPRE-Element, das Poly-A-Signal sowie der Ubiquitin-Promotor und der offene Leserahmen EGFP. Zusätzlich sind die zwei Restriktionsschnittstellen PacI und BamHI eingezeichnet (Lois et al., 2002).

Die ursprüngliche EGFP-cDNA des Plasmids pFUGW wurde zur Generierung spezifischer rekombinanter Viren durch die jeweilige zu exprimierende cDNA ersetzt.

Tabelle 1: Verwendete lentivirale Transferplasmide und ihre Funktionen

Plasmid	Funktion	Tags
pFUW-hFis	Kodiert für das menschliche mitochondriale Fission Protein (Fis-1). Reduziert die Ca^{2+} -Freisetzung im Zytoplasma/Mitochondrien.	Myc-Tag
pBabepuro3 Δ B-Raf:ER	Kodiert für das Fusionsprotein von der katalytischen Domäne von B-Raf und der Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors (McMahon, 2001).	
pFUW	Lentivirales Transferplasmid, das keine kodierende Region enthält. Dient als Kontrollplasmid (Lois C et al., 2002).	
pFUW-Calumenin	Kodiert für das Calcium-Bindeprotein Calumenin im ER.	
pFUW-FLAG NES PV mCherry	Kodiert für das Calcium-Bindeprotein Parvalbumin. Besitzt ein NES zur Lokalisation im Zytoplasma. Es dient als Ca^{2+} -Fänger im Zytosol (Müller et al., 2010).	FLAG-Tag, mCherry-Tag
pFUW-FLAG NLS PV mCherry	Kodiert für das Calcium-Bindeprotein Parvalbumin. Besitzt eine NLS zur Lokalisation im Kern. Es dient als Ca^{2+} -Fänger im Kern.	FLAG-Tag, mCherry-Tag
pFUW-GST PKI	Kodiert für die Proteinkinase I. Besitzt eine NLS zur Lokalisation im Kern. Blockt die PKA-Aktivität im Kern (Thiel & Cibelli, 1999).	GST-Tag
pFUW-SEK-AL	Kodiert für dominante-negative Mutante der MAP-Kinase Kinase SEK1. Inhibiert die Phosphorylierung von JNK (Spohn et al., 2010).	FLAG-Tag
pFUW-MKK6E	Kodiert für eine konstitutiv aktive MKK6-Mutante.	FLAG-Tag

pFUW-mCherry	Aktiviert die p38-Kinase (Müller et al., 2010). Lentivirales Transferplasmid, das keine kodierende Region enthält. Dient als Kontrollplasmid bei Verwendung der PV mCherry-Konstrukte (Müller et al., 2010).	mCherry-Tag
pFUW-REST/CREB	Kodiert für eine dominant-negative Mutante von CREB (Mayer et al., 2008a).	FLAG-Tag
pFUW-REST/Elk-1 Δ C	Kodiert für eine dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1 (Stefano et al., 2006).	FLAG-Tag
pFUW-c-Jun Δ N	Kodiert für eine dominant-negative Mutante von c-Jun (Steinmüller & Thiel, 2003).	FLAG-Tag
pFUW-DA-Raf	Kodiert für eine dominant-negative Mutante von Raf (Mayer et al., 2009).	FLAG-Tag
pFUW-Egr-1/Zn	Kodiert für eine dominant-negative Mutante der Egr-Proteine (Mayer et al., 2011).	FLAG-Tag
pLL3.7	Lentivirales Transferplasmid, das keine kodierende Region einer shRNA enthält. Dient als Kontrollvektor bei Verwendung der pLL-shRNA-Konstrukte (Choi et al., 2006)	GFP-Tag
pLL3.7-Ca _v 1.2	Kodiert für eine Ca _v 1.2 spezifische shRNA. Hemmt die Ca _v 1.2-Expression.	GFP-Tag
pLL3.7-ATF2	Lentivirales Transferplasmid, das für eine ATF2-spezifische shRNA kodiert (Mayer et al., 2011).	GFP-Tag
pLL3.7-TRPM3	Lentivirales Transferplasmid, das für eine TRPM3-spezifische shRNA kodiert (Mayer et al., 2011).	GFP-Tag

2.1.7.3 Lentivirale Reporterplasmide

Bei den Reporterplasmiden wurde die EGFP-cDNA des Plasmids pFUGW (Abbildung 9) gegen die Luziferase-cDNA ausgetauscht. Der Ubiquitin-Promotor wurde durch den jeweilig angegebenen Promotor ersetzt (Abbildung 10).

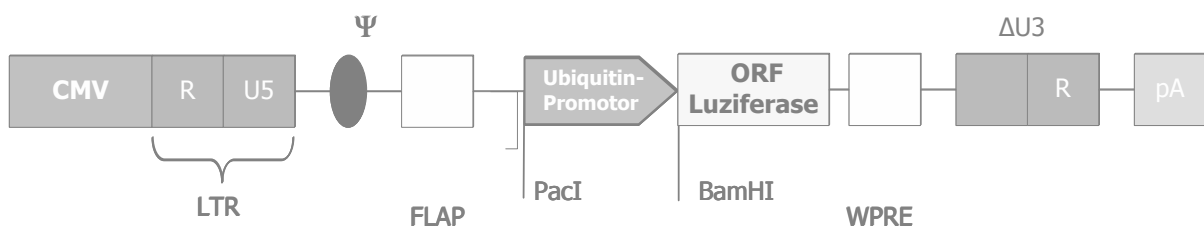


Abbildung 10: Schematische Darstellung des lentiviralen Transfervektors pFUW-luc2

Die verwendeten Transfervektoren sind eine Abwandlung des pFUGW-Plasmids (Abbildung 9). Sie verfügen über zwei LTR-Regionen mit einer Δ U3-Mutation, so dass nach reverser Transkription auch das 5'-LTR diese Deletion besitzt, ein HIV-FLAP, das WPRE-Element, ein lentivirales Packungssignal (Ψ) und ein Poly-A-Signal. Zusätzlich sind die zwei Restriktionsschnittstellen PacI und BamHI eingezeichnet, welche zur Einklonierung des spezifischen Promotors dienen. Das Luziferasegen steht somit unter der Kontrolle des inklonierten Promotors (Lois et al., 2002), (Bauer et al., 2007).

Tabelle 2: verwendete Reporterplasmide und deren Funktion

Plasmid	Funktion
pFW-c-fos luc	Kodiert für das Luziferasegen unter der Kontrolle des c-Fos-Promotors von –711 bis +42. Spiegelt die SRE und CRE-vermittelte Transkription wieder.
pFW-c-fosCRE⁴ luc	Dieses CRE-responsive Reporterplasmid kodiert für das Luziferasegen unter der Kontrolle eines Promotors, der vier <i>tandem repeats</i> der CRE DNA-Bindestelle des menschlichen c-Fos-Promotors enthält. Spiegelt die CRE-abhängige Transkription wider.
pFW-c-JunΔTRE luc	Diese Mutante des 'pFW-c-Jun luc' kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des c-Jun-Promotors von –1600 bis +170, dessen TRE-Site mutiert wurde. Dient der Kontrolle der TRE-vermittelten Transkription.
pFW-c-Jun luc	Kodiert für das Luziferasegen unter der Kontrolle des Kontrolle des c-Jun-Promotors von –1600 bis +170. Spiegelt die TRE-vermittelte Transkription wider.
pFW-coll luc	Kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des humanen Kollagenase-Promotors von –517 bis +63 (Rössler et al., 2008). Spiegelt die AP-1-vermittelte Transkription wider.
pFW-coll mut TRE	Diese Mutante des 'pFW-coll luc' kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des humanen Kollagenase-Promotors von –517 bis +63, dessen TRE-Site mutiert wurde. Dient der Kontrolle der TRE-vermittelten Transkription (Müller et al., 2010).
pFW-Egr1.2 luc	Kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen Egr1-Promotors von – 490 bis + 235. Der Promotor enthält eine CRE-Konsensus Sequenz sowie zwei proximale und drei distale SREs (Rössler et al., 2008).
pFW-EgrSRE luc	Kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen Egr1-Promotors von –117 bis + 235. Der Promotor enthält die beiden proximalen SRE des Egr-1-Promotors (Mayer et al., 2009).
pFW-Ins luc	Kodiert für ein Insulin-Promotor/Luziferase-Reporter (Mayer et al., 2011).

Alle Plasmide wurden von Herrn Professor Thiel, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Homburg (Saar), zur Verfügung gestellt.

2.1.7.4 Plasmide zur Generierung stabiler Zelllinien: Rekombinante Retroviren

Für die Herstellung der rekombinanten Retroviren wird eine Verpackungszelllinie benötigt, welche die viralen, stabil integrierten Proteine gag, pol und env konstitutiv exprimiert. (Aufbau/Struktur HIV-Provirus 2.1.7.1). Dazu wurden von 293T Zellen abstammende Amphi/Phoenix Zellen verwendet. Damit diese Zellen virale Partikel bilden können, muss noch die genetische Information für die virale mRNA in die Zellen eingebracht werden, die

dann durch die Genprodukte der vorhandenen Hilfskonstrukte zu einem infektiösen Retrovirus verpackt wird. Dazu wurde ein retroviraler Vektor verwendet, der einerseits für das einzubringende Transgen, zum anderen für ein Selektionsmarkerprotein kodiert und zur Verpackung der synthetisierten RNA das Verpackungssignal ψ enthält (Abbildung 11). Die rekombinanten Retroviren sind Abkömmlinge von murinen Leukämieviren, weshalb sie nur zur Infektion sich teilender Zellen (Mitosephase) in der Lage sind und deshalb eine Selektion infizierter Zellen im Vergleich zur lentiviralen Infektion notwendig wurde.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des Reporterplasmids pBP3- Δ B-Raf[DD]:ER*

Der Expressionsvektor enthält die Kodierregion des Pyromycin-Gens unter der Kontrolle des SV40 Promotors, enthält die Kodierregion der aktivierten Proteinkinase B-Raf als Fusionsprotein mit der modifizierten Hormon-Bindedomäne des Östrogenrezeptors unter der Kontrolle der *long terminal repeats* (MoMuLV-LTR), eine Ampicillinresistenzkassette (AmpR), einen SV40-ORI und pBR322-ORI sowie das Verpackungssignal ψ . Das Δ B-Raf_[DD]-Fragment sowie das HbER*-Fragment ist jeweils ~ 1 kb groß.

Dieser retrovirale Expressionsvektor (Abbildung 11) enthält die Kodierregion der aktivierten Proteinkinase B-Raf als ein Fusionsprotein mit der modifizierten Hormon-Bindedomäne des murinen Östrogenrezeptors (ERTM, estrogen receptor tamoxifen mutant) von R281 bis Ile 600 (Littlewood et al., 1995) (Abbildung 12) unter der Kontrolle der *long terminal repeats* (LTR) des *Moloney Murine Leukämie Virus* (MoMuLV-LTR).

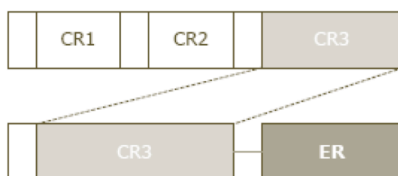


Abbildung 12: Modulare Struktur von Raf und dem Fusionsprotein Δ Raf:ER

Das Δ Raf:ER-Fusionsprotein besteht aus der katalytischen CR3 Domäne von Raf und der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (Thiel & Rössler, 2005).

2.1.8 Zelllinien

HepG2-Zellen

Diese humane Hepatoma-Zelllinie wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Deutschland, käuflich erworben. HepG2-Zellen wurden 1979 aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert.

293T/17-Zellen

Diese menschliche embryonale Nierenzelllinie wurde freundlicherweise von D. Baltimore, Rockefeller Universität, New York, USA, zur Verfügung gestellt (Pear et al., 1993).

INS-1-Zellen

Die primär isolierte Ratten-Insulinoma Zelllinie INS-1 (Asfari et al., 1992) wurde freundlicherweise von Claes B. Wollheim und Susanne Ullrich, Division de Biochimie Clinique, Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Die Strahlen-induzierte Ratten-Insulinoma Zelllinie 1 (Abbildung 13), deren Funktion und Morphologie, insbesondere in Bezug auf die Glukose-abhängige Insulinsekretion, sehr stark den der nativen β -Zellen ähnelt (Asfari et al., 1992) und bei welchen im Gegensatz zu vielen anderen Insulinoma-Zellen die Glukose-Sensitivität partiell erhalten ist, wurde zur Untersuchung der Wirkung von erhöhter Glukosekonzentration auf die Promotoraktivität ausgewählter Gene verwendet.

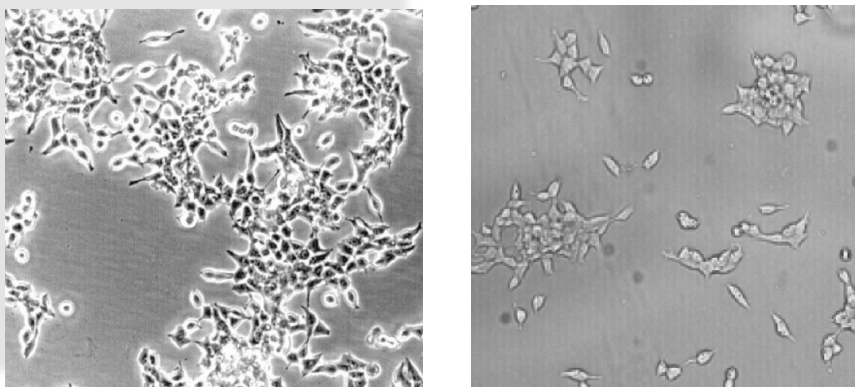


Abbildung 13: INS-1-Zellen

Bild von kultivierten, adhärennten INS-1 Insulinoma-Zellen mittels Phasenkontrast-Mikroskopie (links) bzw. Dunkelfeld-Lichtmikroskop (rechts) dargestellt.

INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen

INS-1-Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, der für die dominant-positive Mutante von B-Raf, Δ B-Raf:ER, kodiert. Die Zellen wurden selbst hergestellt (2.6.4) (Müller et al., 2010).

Phoenix-Ampho-Zellen

Es handelt sich um eine von 293T-Zellen-abstammende MLV-Verpackungszelllinie (Retrovirus-Verpackungszelllinie) mit stabil integrierten Expressionsvektoren für die amphotropen Hüllproteine und die viralen gag-pol-Proteine (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html (2011)). Bei diesen

Konstrukten wurden außerdem die 5'LTR vollständig durch einen RSV-Promotor (bei dem gag-pol-Konstrukt) bzw. CMV-Promotor (bei dem env-Konstrukt) ersetzt, um homologe Regionen zwischen den verwendeten Konstrukten bzw. dem retroviralen Vektor zu verringern. Diese retrovirale Verpackungszelllinie wurde von G. P. Nolan, (Department of Molecular Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University of School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt.

GH3-Zellen

Bei den GH3-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, welche aus radioaktiv-induzierten Hypophysen-Tumoren der Ratte gewonnen wurde.

AtT20-Zellen

AtT20 Zellen wurden aus murinen, corticotropen Hypophysen-Tumoren gewonnen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 5%CO₂ und 37°C in einer feuchten Atmosphäre kultiviert. Die verschiedenen Zellen wurden mit den ihnen eigenen Medien und entsprechenden Zusätzen kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Medien und Zusätze wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Sofern nicht anders beschrieben wurden die Zelllinien in folgendem Medium kultiviert:

DMEM

10%	FCS
25 mM	Glukose
2 mM	L-Glutamin
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

INS-1-Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

RPMI

10%	FCS
10 mM	Hepes
11 mM	Glukose
2 mM	L-Glutamin
50 µM	β-Mercaptoethanol
1 mM	Natriumpyruvat

100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen wurden durch zusätzliche Zugabe von 3 µg/ml Puromycin selektioniert.

Glukose-reduziertes Medium für INS-1-Zellen

DME

0,25%	BSA
2 mM	L-Glutamin
50 µM	β-Mercaptoethanol
2 mM	Glukose
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen wurden durch zusätzliche Zugabe von 0,5% FCS Glukose-reduziert.

2.2.1.2 Passagieren von Säugerzellen

Um die Zellen im teilungsfähigen Zustand zu halten, sie zu vereinzeln, von abgeschiedenen Stoffwechselprodukten zu befreien sowie den Mangel an Nährstoffen zu beseitigen, ist es nötig, die Zellen zu passagieren. Je nach Zelltyp wurde nach einer lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen über eine weitere Subkultivierung entschieden. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturgefäßen (Flaschen und Platten) kultiviert. Zur Subkultivierung von adhärennten Zellen wurde das Kultivierungsmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1x PBS (170 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,84 mM KH₂PO₄ pH 7,2) gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, 0,1% (w/v) EDTA) bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden gelöst haben. Es wurde frisches Medium zugegeben, wodurch das zytotoxische EDTA gebunden wird. Die Zellaggregate wurden in der Suspension durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Zellen wurden in neuen Kultivierungsgefäßen ausgesät.

2.2.1.3 Einfrieren von Säugerzellen

Die Zellen wurden nach Waschen mit 1x PBS mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, mit Medium resuspendiert und 3 min lang in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 200x g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1,5 ml kaltem FCS mit 10% DMSO vorsichtig resuspendiert und in ein eisgekühltes Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Nach Zwischenlagerung bei -20°C über Nacht wurden die Zellen in -80°C

eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff (-196°C) zur langfristigen Aufbewahrung überführt.

2.2.1.4 Auftauen von Säugerzellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde rasch in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und unverzüglich in ein steriles Falcon transferiert, in welchem 9 ml warmes Medium vorgelegt war. Die Zellsuspension wurde 3 min lang bei 200x g zentrifugiert, mit 5 ml Medium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium in der Gewebekulturflasche entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.2 Antikörper

2.2.2.1 AK in der Histochemie

Zur Immundetektion der angefertigten Pankreaspräparate in der Histochemie wurden folgende Antikörper eingesetzt.

Tabelle 3: verwendete Antikörper in der Histochemie

Primärantikörper	von	
Pdx-1	Abcam, (# ab47267)	rabbit-anti
PCNA	Dako, (# M0879)	mouse-anti
Somatostatin	Abcam, (# ab22682)	rabbit-anti
Insulin	Santa Cruz, (# sc9168)	rabbit-anti
Glukagon	Abcam, (# ab10988)	rabbit-anti
BrdU	Oncogene II, (#NA 20-100UG)	mouse-anti
Sekundärantikörper	von	
goat-anti-mouse Antikörper	Jackson Immunoresearch, (#115035003)	polyklonaler Sekundärantikörper; reagiert mit der schweren Kette der „mouse IgG“ und der leichten Kette der meisten Maus-Immunglobuline.
goat-anti-rabbit Antikörper	Jackson Immunoresearch, (#111035144)	polyklonaler Sekundärantikörper; reagiert mit der schweren Kette der „rabbit IgG“ und der leichten Kette der meisten Kaninchen- Immunglobuline.

2.2.2.1 AK in der Zellkultur

Für die Western Blot-Analysen wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 4: verwendete Antikörper

Primärantikörper	von	
Myc-Tag	Abm, Kanada, (# G019)	mouse-anti
c-Jun (H79)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc1694)	rabbit-anti
CREB-1 (H74)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc25785)	rabbit-anti
Egr-1	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc189)	rabbit-anti
ER α (MC20)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc542)	rabbit-anti
FLAG \oplus M2	Sigma, Deisenhofen (# F3165)	mouse-anti
ds red	ClonTech, CA, USA, (# 632496)	rabbit-anti
GST-Tag	selbst hergestellter AK, Martin Jung (AG Zimmermann)	rabbit-anti
HDAC-1 (10E2)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc81598)	mouse-anti
PDX-1	Abcam, UK (# ab47267)	rabbit-anti
P-c-Jun (Ser 73)	Millipore, MA, USA (# 06659)	rabbit-anti
P-CREB-1(Ser133)	Santa Cruz, Heidelberg (# sc101663)	rabbit-anti
P-ERK1/2 (K-23)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc153)	rabbit-anti
c-Fos	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc52)	rabbit-anti
GAPDH (FL-335)	Santa Cruz, Heidelberg, (# sc25778)	rabbit-anti
Ca _v 1.2	selbst hergestellter AK, (AG Flockerzi)	rabbit-anti
Calumenin	selbst hergestellter AK, (AG Zimmermann, Martin Jung)	rabbit-anti
GFP	Roche, Mannheim, (# 11814460001)	mouse-anti
Sekundärantikörper	von	
Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti-mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Resarch Lab., Baltimore, USA, (# 115035003)	
Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti rabbit IgG (H+L)	Sigma, Deisenhofen, (#A4416) Jackson Immuno Resarch Lab., Baltimore, USA (#111035003)	

2.3 Primer

2.3.1 Primer für die Genotypisierung

Tabelle 5: Primer zum Nachweis der Transgene

Transgen	Primer 5'-3'	Produktgröße (bp)
RIP	forward GTGAAGTGGGTCCGCGTACAG reverse G TACTCGTCAATTCCAAGGCATCG	391
RIP	forward TCTGGCCATCTGCTGATCCA reverse G TACTCGTCAATTCCAAGGCATCG	1045
β -Gal	forward CAAACCATCGAAGTGACCAG reverse CCTGACTGGCGTTAAATTG	400
Egr-Zn	forward CGATTACAAGGATGACGATGA reverse TCACTGCATTCTAGTTGTGG	600
Egr-Zn	forward AAAGAAGCGCAAGGTAGGTG reverse TGCAGGATTTCGACACTGCAAG	200

REST-ELK1 Δ C forward CGATTACAAGGATGACGATGA 1050
reverse TCACTGCATTCTAGTTGTGG

Die Lage der Primer innerhalb des jeweiligen Vektors sind in Abbildung 14 zu sehen.

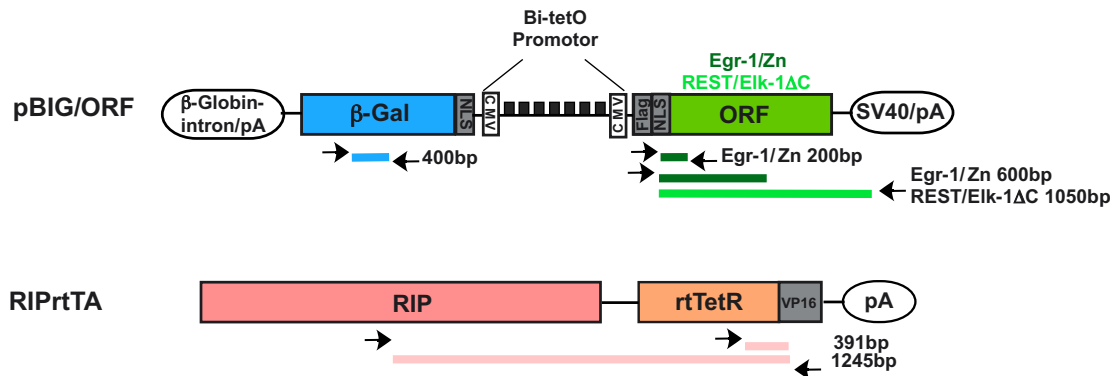


Abbildung 14: Lage der Primer in pBIG und RIPrtTA-Vektor

Oben: Der Expressionsvektor pBIG enthält den direktionalen *Bi-tetO-Promotor* mit Promotorregion des *Cytomegalo-Virus* (CMV), der im offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) die Expression von β -Galaktosidase (β -Gal) sowie die Expression von Egr-1/Zn bzw. REST/Elk-1 Δ C steuert. Kernlokalisierungssequenzen (NLS) und Poly-A-Signale (pA) aus β -Globin bzw. des *Simian-Virus* (SV40). Primer (Pfeile) und Primerprodukt (Balken) des jeweiligen Genabschnittes sind eingezeichnet. Unten: Der Expressionsvektor RIPrtTA enthält den Ratten-insulin-Promotor II (RIP), der die Expression des reversen Tetrazyklin-Aktivators (rtTA) steuert und ein Poly-A-Signal. Primer (Pfeile) und Primerprodukt (Balken) des jeweiligen Genabschnittes sind eingezeichnet.

2.3.2 Primer für RT-PCR

Tabelle 6: verwendete Primer für mRNA-Analyse mittels qRT-PCR/ RT-PCR

Gen (Maus)	Primer 5'-3'	Produktgröße (bp)
18SrRNA	forward GTAACCCGTTGAACCCATT reverse CCATCCAATCGGTAGTAGCGA	151
GAPDH	forward TTGTGATGGGTGTGAACCAC reverse GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	170
β -Actin	forward GGCTGTATTCCCCTTCCATCG reverse CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154
Insulin	forward CCAGCTATAATCAGAGACCA reverse GTGTAGAAGAAGCCACGCT	196
Pdx-1	forward GAAATCCACCAAAGCTCACG reverse AATTCCTTCTCCAGCTCCAG	100
Glut2	forward GGCTAATTTTCAGGACTGGTT reverse TTTCTTTGCCCTGACTTCCT	300
Glukagon	forward TTACTTTGTGGCTGGATTGCTT reverse AGTGGCGTTTGTCTTCATTCA	149
VEGF-A	forward ACTGGACCCTGGCTTTACTG reverse TCTGCTCTCCTTCTGTCTGTG	80
Ca _v 1.3	forward GACTCAGATTACAACCCAGG reverse GTGGTGTCTTTCGCAGGGTA	640
Ca _v 1.2	forward GGAGCTGGACAAGGCTATGA	650

	reverse GACCTAGAGAGGCCAGAGCGA	
TRPM3	forward GAATCGGTCAAGGGGTTCCAG	470
	reverse ACTGCTGCCCGTAAATAAAGATC	
c-Fos	forward ACCATGATGTTCTCGGGTTTCAA	1000
	reverse GCTGGTGGAGATGGCTGTAC	
c-Jun	forward AGAGCGGTGCTTACGGCTACAGTAA	100
	reverse CGACGTGAGAAGGTCCGAGTTCTTG	
Egr-1	forward AGCGAACAACCCTATGAGCAC	100
	reverse TCGTTTGGCTGGGATAACTCG	
Egr-2	forward AGGTTTTGTCAGCTACACCTACA	190
	reverse AGATTGGCTTCACAGGCTCC	
Egr-3	forward GACTCGGTAGCCCATTACAATC	150
	reverse ACTTTCCCAAGTAGGTCACGG	

2.4 RNA-Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Nach Zellyse wird die Gesamt-RNA isoliert und die schädlichen RNAsen inhibiert. Die Gesamt-RNA besteht vorwiegend aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und messenger RNA (mRNA), wobei die mRNA nur einen Anteil von ca. 2% hat, was für viele Anwendungen, wie zum Beispiel RT-PCR und Northern Blot Hybridisierung, genügt.

Die Inseln bzw. kultivierten Zellen wurden mit „Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline“ DPBS (ohne Mg^{2+} , Ca^{2+}) in einem sterilen RNase-freien Eppendorfgesäß gewaschen, mit Trypsin/EDTA zur Vereinzelnung für 3 min verdaut und für 3 min bei $300\times g$ $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Zur Isolation der Gesamt-RNA aus den Inseln des Pankreas bzw. den kultivierten Zellen wurde ein RNA-Isolationskit (Qiagen RNeasy Plus Micro Kit) nach Herstellerangaben verwendet.

Die cDNA-Synthese wurde mittels einer *Reversen Transkriptase* ("RevertAid M-MuLV RT"), eines RNase-Inhibitors sowie *Random-Hexamer-Primer* durchgeführt (2.4.3).

2.4.2 RNA-Messung

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurde die optische Dichte (OD) der RNA ermittelt. Es wurde eine 1:50 Verdünnung der RNA hergestellt und die Messung mit dem Photometer (Biophotometer, Eppendorf) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm in 2 ml Plastikküvetten von Eppendorf durchgeführt. Als Indiz der Reinheit sollte der Quotient von 260/280 nm zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Quotienten unter 1,6 lassen auf eine Kontamination der RNA mit Proteinen oder mit Phenol schließen. Eine Extinktion von 1 bei 260nm (E_{260}) entspricht etwa 40 μg RNA.

2.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels einer reversen Transkription nach dem Standardprotokoll zur M-MuLV-Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) von Fermentas durchgeführt. Dafür wurden 2 µg RNA als Template verwendet, 1 µl Random-Hexamer Primer zugesetzt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 11 µl aufgefüllt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 70°C ließ man das Gemisch auf Eis kurz abkühlen. Anschließend wurde der RNA ein Mix aus 5 x M-MuLV Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 mM dNTPs, 200 U M-MuLV Reverse Transkriptase, 20 U RNase Inhibitor und 1,5 µl DEPC-H₂O zugegeben. Dieser Mix wurde zunächst bei 20°C für 10 min, danach bei 37°C für 59 min und abschließend 5 min lang bei 95°C inkubiert. In der Negativkontrolle wurde die reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt. Nach einem 10 minütigen Abkühlen bei 4°C wurde die cDNA bis zur weiteren Verarbeitung (2.5.1) bei -20°C oder zur längerfristigen Aufbewahrung bei -70°C gelagert.

2.5 DNA-Methoden

2.5.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Eine Methode zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäure-Abschnitte *in vitro* ist die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Durch Amplifizierung geringster Mengen an cDNA mittels PCR kann das Expressionsprofil von Genen erhalten werden. Die aus der reversen Transkriptionsreaktion (RT) erhaltene cDNA (2.4.3) bzw. genomische DNA der verdauten Mausbiopsien diente in der PCR als Template. Es wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR durchgeführt. Die PCR-Reaktion - nach vorangegangener reversen Transkription - wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 7: RT-PCR-Reaktionsansatz

2 µl	cDNA
500 nM	forward Primer
500 nM	reverse Primer
1x	Taq Puffer
0,25	mM dNTPs
0,5 U	Taq Polymerase
auf 20 µl	mit H ₂ O auffüllen

Die PCR-Reaktionen wurden im „Labcycler“ (Sensoquest) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 8: RT-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Annealing	59°C	30 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. Finale Elongation	72°C	10 min

} x 27

Die PCR-Reaktion zur Genotypisierung wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung

2 µl	cDNA
500 nM	forward Primer
500 nM	reverse Primer
1x	Taq Puffer
0,5 mM	dNTPs
0,5 U	Taq Polymerase
auf 25 µl	mit H ₂ O auffüllen

Zur Genotypisierung wurde folgende Parameter am „Labcyler“ (Sensoquest) eingestellt:

Tabelle 10: Genotypisierung PCR-Programm für β-Gal, Egr/Zn, REST/Eik-1ΔC

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	40 sec
3. Annealing	60°C	30 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. Finale Elongation	72°C	10 min

} x 35

Tabelle 11: Genotypisierung PCR-Programm für RIP

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	40 sec
3. Annealing	63°C	30 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. Finale Elongation	72°C	10 min

} x 35

Mit Hilfe des Programms „Primer3 Input“ des Whitehead Institute Center für Genome Research (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi (2011)) wurden die verwendeten Primer generiert oder der Primerbank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> (2011)) nach Prüfung entnommen (Tabelle 5, Tabelle 6). Die in der qRT-PCR (2.5.4) verwendeten Primer sind derart design, dass sie Intron-überspannend sind. Somit wird die

Amplifikation von unerwünschter, genomischer DNA ausgeschlossen bzw. detektiert. Die amplifizierte DNA wurde wie in (2.5.2) beschrieben elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

2.5.2 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, bei der die DNA bei angelegter elektrischer Spannung vom Minus- zum Pluspol durch das Gel läuft und der Größe nach aufgetrennt wird: Größere Fragmente laufen langsamer als kleinere. Die Proben wurden je nach Fragmentgröße auf ein 1- oder 2-%iges Agarosegel aufgetragen. Dazu wurden pro Gel 50 ml 1x TAE-Puffer (bestehend aus 40 mM Tris-Acetat (pH 7,2) und 1 mM EDTA) mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Agarose vollständig gelöst und erkaltet war, wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach der Auspolymerisierung wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und die DNA-Proben mit einer entsprechenden Menge 6-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF, 40% (w/v) Saccharose), und in die Taschen aufgetragen. Danach wurde eine Spannung von 70V angelegt, was zur Auftrennung der DNA-Fragmente führte. Als Größenmarker diente der 100bp DNA Ladder Plus der Firma Fermentas.

Aufgrund der Interkalierungsfähigkeit des Ethidiumbromids zwischen den Basen der DNA-Proben konnten die Fragmente mittels einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht werden.

2.5.3 Dokumentation und Analyse der DNA

Die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels eines Geldokumentationssystems (Biorad) fotografiert. Eine Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.5.4 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR wurde mit der synthetisierten cDNA in Anwesenheit von "Brillant SYBR Green QPCR Master mix" und den entsprechenden Gen-spezifischen Primern (Tabelle 6) mit einem real-time RT-PCR-Gerät der Fa. Stratagene (Mx3000P) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, um die Expression von Insulin, Glukagon, Pdx1, Glut2 und VEGF-A nachzuweisen. Das Gerät im Institut für Experimentelle Orthopädie konnte für diese Studien benutzt werden. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen. Es wurde ein Master-Mix hergestellt, indem 12,5 µl der Mix-Lösung ("Brillant SYBR Green QPCR Master mix") mit 0,375 µl Primer-Mix (150 nM) und 10,75 µl

Wasser je Ansatz gemischt wurden. Zu diesen 24 μl Master-Mix wurde zu jeder Reaktion 1 μl cDNA (1:10) pipettiert. Die eingestellten Parameter der PCR sind in Tabelle 12 dargestellt. In der PCR-Master-Mix Lösung befindet sich der Zyanin-Farbstoff SYBR-Green, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Der entstandene Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 521 nm. Dabei gilt die Annahme, dass sich mit jedem Zyklus die DNA verdoppelt. Somit kann bei der real-time PCR die amplifizierte DNA von jedem Zyklus in „Echtzeit“ gemessen werden. Die qRT-PCR-Daten werden mit einer etablierten Standardmethode (Livak et al., 2001) analysiert.

Tabelle 12: qRT-PCR-Parameter

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C] x 35
3. Annealing	61°C	
4. Elongation	72°C	
5. Finale Elongation	72°C	

Nach Ablauf der 40 Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte durch eine Schmelzkurvenanalyse auf Nebenprodukte überprüft. Zur Normierung der Daten diente die Expression von 18S rRNA (Normalisierungsgen).

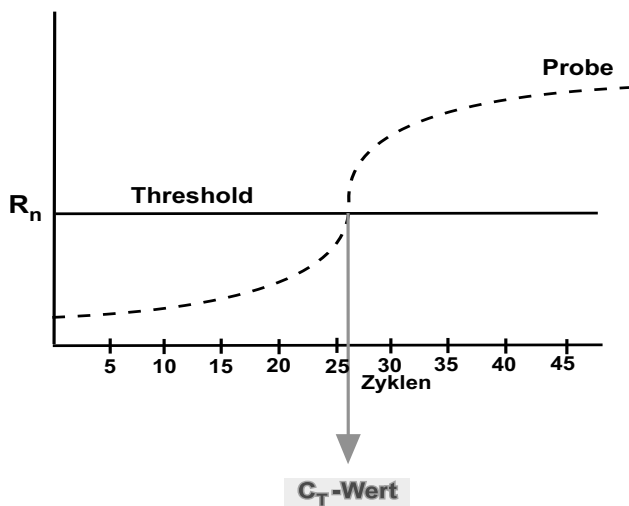


Abbildung 15: Bestimmung des CT-Wertes

Der Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität über den Hintergrund steigt, wird als CT-Wert bezeichnet. In diesem Beispiel ist der CT-Wert (Zykluszahl) 18.

Als C_q -Wert (*cycle quantification*) wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenzintensität der DNA-Amplifikation den Schwellenwert (Hintergrund) erreicht. Der Schwellenwert wurde manuell bestimmt. Die Berechnung der Vervielfältigung der Genexpression erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ Methode ("delta-delta C_q Methode"):

$$\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Normalisierungsgen}$$

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ Zielgen} - \Delta C_q \text{ Kontrolle}$$

$$R \text{ („relative expression ratio“ des Zielgens)} = 2^{-[\Delta\Delta C_q]}$$

$$\text{wenn } E_{\text{Zielgen}} \text{ („individual real-time PCR efficiencies“)} = E_{\text{Kontrolle}} = 2$$

Die Genexpression des Zielgens wurde auf die des Normalisierungsgens normiert und als vielfache Induktion relativ zum Kontroll-Ansatz ausgedrückt.

2.5.5 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese der TRE-Sequenz im Promotor des Kollagenasegens erfolgte mittels PCR unter Verwendung des „Quickchange II XL™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Bei der gezielten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) wird mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers, der die gewünschte Mutation trägt, der Austausch einer oder mehrerer Basen in einen Strang der zirkulären Plasmid-DNA induziert und mittels PCR amplifiziert. Der parenterale, methylierte Strang wird im Anschluss mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches nur methylierte DNA spaltet, abgebaut und die amplifizierte, mutierte, einzelsträngige DNA in Bakterien transformiert, die dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt wird (Shenoy & Visweswariah, 2003).

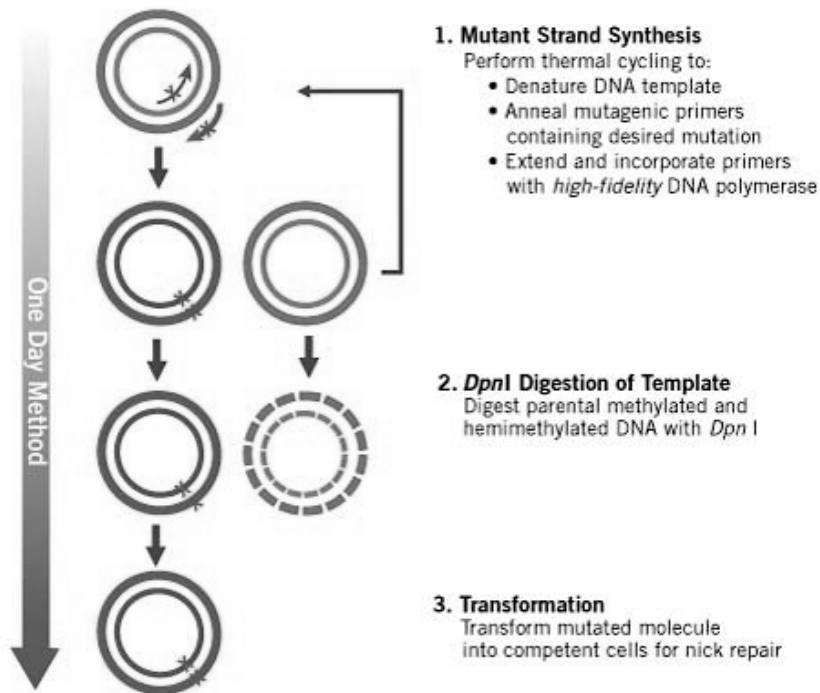


Abbildung 16: Schema der gezielten Mutagenese „site-directed mutagenesis“ nach Stratagene
Abbildung von (http://2008.igem.org/wiki/images/4/46/_QuikChange.jpg (2011))

Als Startermoleküle zur Mutagenese dienten die in Tabelle 13 aufgeführten Oligonukleotide. Die flankierenden Bereiche um das auszutauschende Nukleotid sollten mindestens 10 Basen umfassen, damit das Oligonukleotid trotz einer möglichen Fehlpaarung mit dem auszutauschenden Nukleotid hybridisiert. Entsprechende Oligonukleotide wurden mithilfe des „Quik-Change-Primer Design“-Programms generiert. Die Mutation wurde anhand der Quelle (Ayala et al., 2002) gewählt. Die Synthese der zur PCR verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma Genosys (Steinheim).

Tabelle 13: Zur Mutagenese verwendete Primer

Die Positionen, die zu einem Basenaustausch der TRE (TGAGTCA) → TREmut TGATAGT führten, sind unterstrichen.

Primer 5'-3'	
Sense	AATCAAGAGGATGTTATAAAGCATGAT <u>AGT</u> GACAGCCTCTGGCTTTCTGGAAG
Antisense	CTCCAGAAAGCCAGAGGCTGTC <u>ACT</u> ATCATGCTTTATAACATCCTCTTGATT

Der Reaktionsmix wurde laut Herstellerangaben spezifisch für Primer und Template (Tabelle 14) zusammengesetzt.

Tabelle 14: Mutagenese PCR-Reaktionsansatz

5 ml	10x Reaktionspuffer
10-500 ng	dsDNA/ Template (coll luc)
125 ng	Primer 1
125 ng	Primer 2
1 µl	dNTP-Mix
3 µl	QuikSolution-Reagenz
auf 50 µl	mit H ₂ O auffüllen
1 µl	<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Die Annealingsstemperatur lag bei 68°C, jeweils 10°C unter der Schmelztemperatur der Startermoleküle. Die PCR wurde mit folgenden Parametern ausgeführt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Mutagenese PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	1 min
2. Denaturierung	95°C] x 18
3. Annealing	68°C	
4. Elongation	68°C	
5. Finale Elongation	68°C	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden je 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) zu jeder PCR-Probe zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Transformation erfolgte in XL10-Gold Bakterien. Je Probe wurden 45 µl Bakterien in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Inkubation der Bakterien für 10 min mit 2 µl β-Mercaptoethanol wurde in jedes Gefäß je 2 µl der *Dpn*I verdauten PCR-Probe gegeben. Nach 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 30 sec in einem 42°C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort für weitere 2 min auf Eis inkubiert, mit 500 µl vorgewärmtem NZY⁺-Medium gemischt, 1 h bei 37°C und 230 rpm inkubiert und anschließend auf LB-AMP-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden aufbereitet und die DNA mittels Sequenzanalyse überprüft.

NZY⁺-Medium:

10 g/l	NZ-Amin (Caseinhydrolysat)
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl pH mit NaOH auf 7,5 einstellen

Folgende Zusätze wurden steril filtriert und vor Gebrauch frisch zugegeben:

12,5 ml	1 M MgCl ₂
12,5 ml	1 M MgSO ₄
10 ml	2 M Glukose

Die DNA-Sequenzierung wurde von LGC Genomics (Barcode-Sequenzierung) durchgeführt.

2.5.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Der transformationskompetente *E.coli* Stamm XL-1 Blue bzw. DH5 α wurde von -80°C langsam auf Eis aufgetaut und 100 μ l mit 20 μ l einer Ligation und 120 μ l CM-Puffer 33 mM CaCl₂, 55 mM MgCl₂, 110 mM KCl auf Eis für 20 min inkubiert.

Für eine Retransformation wurden 2 μ l Plasmid mit 50 μ l *E.coli* und 60 μ l CM-Puffer vermischt und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurden 500 μ l LB-Medium (820 g Hefeextrakt, 40 g Trypton, 20 g NaCl, ad 4 l H₂O bidest., pH 7,2; Antibiotika zur Selektion der Bakterien, die Plasmid mit entsprechenden Resistenzgenen enthalten) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C auf den Schüttler gestellt. Das Bakteriengemisch wurde auf 2 mit Ampicillin und Tetrazyklin versetzten LB-Platten verteilt, welche zuvor mit 150 μ l X-Gal 30 mg/ml in Dimethylformamid (DMF) und 60 μ l IPTG 0,1 M ausgestrichen wurden, um über Nacht bei 37°C im Brutschrank zu wachsen.

2.5.7 Blue-White-Screening

Das *E.coli* LacZ-Gen kodiert für die β -D-Galaktosidase (β -Gal). Dieses setzt das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) zu Galaktose und löslichem Indoxyl um, welche dann spontan zu unlöslichem 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo oxidieren. Als Induktor dient das Laktose-Analogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die bei der Hydrolyse von X-Gal entstehende blaue Farbe dient somit zum Nachweis der β -Gal Aktivität. Die positiven, weißen Klone wurden mit einer Einmalimpföse gepickt, in 4 ml LB-Medium mit 4 μ l Ampicillin (100 mg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler wachsen lassen.

2.5.8 Mini-Plasmidpräparation

Die Übernachtskultur wurde zur Sicherung auf LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C solange inkubiert, bis deutliche Kolonien angewachsen waren und dann bei 4°C aufbewahrt. Die restlichen Bakterien wurden 10 min bei 4420x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde auf Eis in 200 μ l P1 (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 10 mg/ml RNase) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Hinzufügen von 200 μ l P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde das Eppendorfgefäß mehrmals über Kopf bewegt, schließlich 200 μ l P3 (3 M Kaliumacetat (pH 5,5)) hinzugegeben und erneut invertiert.

Anschließend wurde für 10 min bei 16060x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurde 600 μ l Phenol/Chloroform hinzugegeben, gevortext und 10 min bei 16060x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein Eppendorfgefäß überführt, 420 μ l Isopropanol hinzugeführt und gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 30

min bei 16060x g und 4°C. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen und für 30 min bei 16060x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet im Evaporator getrocknet. Je nach Pelletgröße wurden 6-20 µl TE (1 M Tris (pH 7,4), 0,5 M EDTA) zugegeben und bei 37°C für 15 min resuspendiert.

2.5.9 Maxi-Plasmidpräparation

Um größere, aufgereinigte Plasmidmengen von transformierten Bakterien mit gewünschtem Insert zu erhalten, wurde eine Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt. Die Bakterienkultur wuchs in 50 ml LB + 50 µl Ampicillin (100 mg/ml) über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden die Kulturen in 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 min bei 4420x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml TEG (25 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM Glukose) mit 12 mg/ml Lysozym resuspendiert und anschließend zuerst 10 ml P2 und dann 10 ml P3 hinzugegeben und mehrmals invertiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 4420x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, die weiße Deckschicht abgehoben und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit Isopropanol auf 50 ml aufgefüllt, geschüttelt und bei 5500 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das getrocknete Pellet wurde in 400 µl TE/EDTA/SDS 50 ml TE, 1 mM EDTA, 0,5% SDS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 10 µl RNase (10 mg/ml) wurden sie bei 65°C für 30 min inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA wurden 400 µl Phenol/Chloroform zugefügt, gevortext und 15 min bei 16060x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, 400 µl Chloroform hinzugefügt, erneut gevortext und für 15 min bei 16060x g und RT zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein Eppendorfgefäß wurden zur weiteren DNA-Fällung 40 µl Natriumacetat (3 M) sowie 1 ml 100%iges Ethanol hinzugefügt, gevortext und 30 min bei 16060x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 30 min bei 16060x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde im Evaporator getrocknet und schließlich in 400 µl TE bei 37°C für 20 min resuspendiert.

2.5.10 Quiagen-Maxi

In 250 ml LB-Medium mit 250 µl Ampicillin wurde eine 50 ml angeimpfte Übertag-Kultur überimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand bei 4420x g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml P1 mit 10 mg/ml RNase resuspendiert. Anschließend wurden 20 ml P2 hinzugefügt, invertiert und für 5 min inkubiert, bevor 20 ml Puffer 3 hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert wurden. Es folgte eine

weitere Zentrifugation bei 4420x g für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde auf eine Quiagen-tip 500 Säule überführt, nachdem diese mit 10 ml QTB (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, (pH 7,0), 15% Isopropanol (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v)) äquilibriert wurde, zweimal mit 30 ml QC 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% Isopropanol (v/v) gewaschen und die DNA schließlich mit 15 ml Puffer QF 1,25 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,5), 15% Isopropanol (v/v) von der Säule in ein neues Gefäß eluiert.

Die Fällung wurde mittels Zugabe von 11 ml Isopropanol erreicht, worauf ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 2000x g und 4°C folgte. Nach Entfernen des Überstandes konnte ein Waschschrift mit 5 ml 70%igem Ethanol durchgeführt werden. Erneut wurde der gevortexte Ansatz bei 4420x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Resuspension wurde das getrocknete Pellet je nach Größe in 100-300 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die DNA-Menge wurde photometrisch bestimmt und 0,5 µg DNA der Probe mit 2 µl des Sequenzierprimers versetzt. Das Gesamtvolumen sollte 7 µl betragen. Die Probe wurde zum Sequenzieren an die Firma Sequence Laboratory Göttingen GmbH versandt.

2.5.11 Restriktion von DNA

Um anschließend zu überprüfen, ob Plasmide richtig in die Bakterien kloniert wurden, wurde ein analytischer Restriktionsverdau (siehe Tabelle 16) durchgeführt.

Tabelle 16: Restriktionsansatz

2 µl	DNA
0,5 µl	Enzym A
0,5 µl	Enzym B
1 µl	10x Puffer (zu den Enzymen passend)
6 µl	TE-Puffer

Der Verdau erfolgte bei 37°C für mindestens 1 h und die Proben konnten nachfolgend mittels eines Agarosegels analysiert werden.

Die Plasmide der Maxi-Plasmidpräparation wurden zunächst in einem analytischen Restriktionsverdau auf die richtigen Inserts überprüft. Um nach Erhalt einer positiven Bande das richtig orientierte Insert präparativ aus dem Vektor zu schneiden und dabei optimale Bedingungen für die Restriktionsenzyme zu gewährleisten, wurde zuerst nur mit einem Enzym verdaut (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: präparativer Restriktionsansatz Teil 1

140 µl	DNA
20 µl	10x Puffer (zum Enzym passend)
8 µl	Enzym
2 µl	BSA
30 µl	TE-Puffer

Dieser Ansatz inkubierte bei 37°C über Nacht.

Am folgenden Tag erfolgte die Aufreinigung der verdauten DNA zur Entfernung von Proteinen, Puffern und Enzymen mit Hilfe der Phenol-Chloroform Extraktion (siehe 2.5.12)

Mit dem gereinigten, in TE-Puffer aufgenommenen Plasmid wurde der zweite Übernacht-Verdau (Tabelle 18) durchgeführt und bei 37°C inkubiert:

Tabelle 18: präparativer Restriktionsansatz Teil 2

40 µl	DNA
20 µl	10xPuffer (zum Enzym passend)
6 µl	Enzym
134 µl	TE-Puffer

Am nächsten Morgen wurde mit diesem Ansatz erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und das Pellet in 40 µl TE aufgenommen.

2.5.12 Reinigen der DNA: Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung der DNA, d. h. zur Entfernung von Proteinen, Puffern und Enzymen wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. 1 Volumen Phenol/Chloroform wurde zur gelösten DNA gegeben, gevortext und für 5 min bei 16060x g und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 Volumen Chloroform zur Entfernung von Phenolrückständen hinzugefügt und wieder gevortext. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde 1 Volumen NH₄OAc (5 M) sowie 2,5 Volumen kaltes, 100%iges Ethanol dazugegeben, mehrmals invertiert und 30 min bei 16060x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene NH₃ konnte dabei als Gas entweichen. Alternativ kann 1/10 Volumen NaOAc [3 M] zugegeben werden, wobei das Natrium in der Lösung verbleibt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 30 min bei 16060x g und 4°C zentrifugiert. Zur präparativen Plasmidisolierung im Anschluss an die Phenol-/Chloroform-Extraktion des Übernacht-Verdau wurde die Ligation auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.6 Manipulation eukaryontischer Zellen durch lentivirale Infektion

2.6.1 Produktion von Lentiviren mittels Calciumphosphat-Transfektion in 293T/17

Die Plasmide sind im Abschnitt 2.1.7 beschrieben.

Zum erfolgreichen Gentransfer ist eine Cotransfektion mit den folgenden drei Konstrukten nötig: Das Verpackungsplasmid enthält die Gene gag und pol, das VSV-G Expressionsplasmid enthält Gene für die env-Proteine. Um infektiöse Partikel herstellen zu

können, werden die Verpackungszellen 293T mit den genannten drei Plasmiden co-transfiziert. Die hier verwendete Transfektionsmethode zur Herstellung der Virenpartikel war die Calcium-Phosphat-Präzipitation. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293T/17 wurde zur Transfektion verwendet, da sie eine hohe Transfektionsrate aufweist. Hierzu werden 24 h vor der Transfektion $2,0 \times 10^6$ 293T/17 Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und 24 h lang kultiviert. Für jeden Transfervektor wurde eine Calciumphosphat-Transfektion angesetzt. Hierzu wurde pro Transfervektor ein Ansatz aus zwei Lösungen verwendet. Lösung 1 besteht aus der benötigten Menge an DNA in Form der verschiedenen Plasmide, die mit Wasser auf 250 µl aufgefüllt wurden. Es wurden 5 µg des Packungsplasmids, 2,3 µg des VSV-G Expressionsplasmids und 6,6 µg des Transfervektors zur Transfektion verwendet. Der DNA-Gehalt (OD) der Plasmide wurde im Voraus photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei der Quotient OD_{280nm}/OD_{260nm} der Überprüfung des Reinheitswertes (2,0) diene. Aus diesen Werten wurde das einzusetzende Volumen der Plasmid-Lösung errechnet. Zusätzlich wurde zur Lösung 1 250 mM $CaCl_2$ zugegeben. Lösung 2 bestand aus 2x HBSS (274 mM NaCl, 25 mM KCl, 3,75 mM Na_2HPO_4 , 27,75 mM Glukose und 105 mM HEPES pH 7,05-7,12). Lösung 2 wurde zu Lösung 1 getropft, wobei Lösung 1 vorsichtig besprudelt wurde. Das Medium der 293T Zellen wurde abgenommen und durch das Medium, das 25 µM Chloroquin enthielt, ersetzt. Chloroquin hemmt die lysosomalen DNasen, indem es den pH-Wert in den Vesikeln neutralisiert. Es wirkt somit dem Abbau des Calciumphosphat/DNA-Gemisches entgegen und steigert die Transfektionseffizienz. Dann wurden den Zellen 500 µl des Gemisches aus Lösung 1 und Lösung 2 zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für acht Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen unter S2-Bedingungen (gentechnische Sicherheitsstufe 2) zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach zwei bis drei Tagen konnten die Virenpartikel aus dem Mediumüberstand geerntet und weiter verwendet werden.

2.6.2 Lentivirale Infektion

Um ein möglichst zellnahes Modell zum Nachweis eines spezifischen Genexpressionsmusters zu erhalten, wurden lentivirale Vektoren, welche das Gen von Interesse tragen, in das Chromatin verschiedener Zelllinien eingebaut. Zellen wurden 48 h vor der Infektion in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die virenhaltigen Überstände der Verpackungszelllinie 293T/17 abpipettiert und durch einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert. Das Filtrieren entfernte vom Plattenboden gelöste, im Überstand vorhandene 293T/17 Zellen. Nach Zugabe von 8 µg/ml Hexadimethrin-Bromid (Polybrene) zum virenhaltigen Überstand wurde dieser auf die zuvor ausgesäten Zielzellen gegeben. Nach 8-16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Virenüberstände unter S2-

Bedingungen abgenommen und durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h waren die Zellen nicht mehr infektiös, so dass die weiteren Behandlungsschritte wie Serumreduktion durchgeführt werden konnten. Zum Nachweis einer veränderten Promotoraktivität spezifischer Gene wurden Reportergene durch lentivirale Vektoren in das Chromatin der verschiedenen Zelllinien eingebaut, wobei das Luziferasegen als Reporter diente. Durch Messung der Luziferaseaktivität 2.6.3 konnte die Genexpression bei Stimulation untersucht werden.

Zur Bestimmung der Transfektions- und Infektionseffizienz wurde das Referenzplasmid HIV-7 β -Gal mitgeführt (Kowolik & Yee, 2002), welches die Transkriptionseinheit besitzt, die für das Enzym der β -Galaktosidase kodiert. Durch Inkubation mit einer X-Gal versetzten Lösung konnte die Effizienz der transfizierten und infizierten Zellen anhand der Blaufärbung abgeschätzt werden.

2.6.3 Reporteranalysen

Reporteranalysen dienen zur Untersuchung genregulatorischer DNA-Sequenzabschnitte in Säugerzellen (Alam & Cock, 1990). Es werden spezifische Enhancer- und Promotorelemente vor Reportergene inkloniert, so dass bei Aktivierung des Promotors das Reportergen, in unserem Fall das Enzym Luziferase, exprimiert wurde (Abbildung 17).

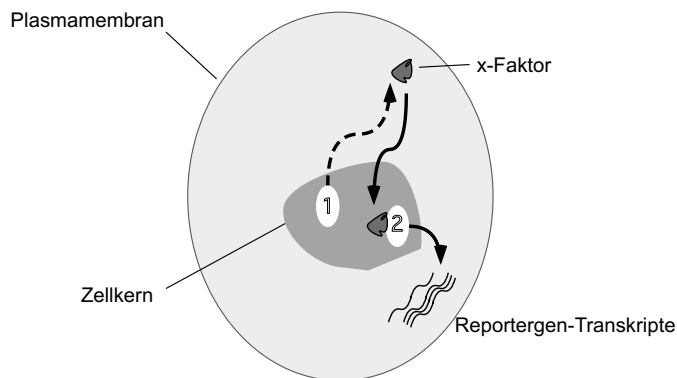


Abbildung 17: Reporter-System

Schematische Übersicht eines Reporter-Systems: 1= Stimulus, 2= Reportergen/Zielgen, x-Faktor=Signal/ Transkriptionsfaktor

Die zu untersuchenden Reportergene wurden mittels lentiviralen Gentransfers in das Genom der Wirtszelle integriert. So konnte die Transkription der eingebrachten Gene im natürlichen chromosomalen Umfeld untersucht werden. Die Infektionen wurden in einem vierfachen Ansatz durchgeführt und für jede Einzelprobe wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Die lentiviral infizierten Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, geerntet und anschließend in 50 μ l Reporterlysepuffer für 10 min auf Eis aufgeschlossen. Je 10 μ l des erhaltenen Gesamtzellextrakts wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte

pipettiert und mit 100µl *Working Luciferase Assay Reagent* (9 Vol. Luciferase Assay Reagent Stock (22 mM Tricine pH 7,8, 1,177 mM (MgCO₃)₄ Mg(OH) 2x 5H₂O, 2,94 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0,11 mM EDTA, 36,3 mM DTT, 297 µM Coenzym A, 583 µM ATP) +1 Vol. 4,7 mM Luziferin) versetzt. Gibt man nun das Substrat D-Luziferin hinzu, wurde die Oxidation des Oxylyziferin durch die Luziferase katalysiert. Unverzöglich wurde die Luziferaseaktivität im Luminometer gemessen. Die gemessenen Lichteinheiten (λ = 562 nm) wurden mittels des Programms *Simplicity-Photocounter* erfasst.

Die relative Luziferaseaktivität wurde nach folgender Formel bestimmt, indem die gemessenen Luziferaseaktivitäten (LU) in Beziehung zur jeweiligen Proteinkonzentration der Probe (siehe 2.7.4) gesetzt wurden :

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Lichtunits ILUI}}{\text{Proteingehalt } [\mu\text{g}]}$$

Aus vier gemessenen Werten pro Ansatz wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Balkendiagramm.

2.6.4 Retrovirale Infektion zur Generierung stabiler Zelllinien

Zur Transfektion wurden Phoenix/Ampho-Zellen (2.1.8) verwendet, die als Verpackungszelllinie dienen. Diese wurden in einer Zelldichte von $2,4 \times 10^6$ auf 60 mm Schalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode (2.6.1) transfiziert. Die verwendeten Plasmide sind im Abschnitt 2.1.7.4 beschrieben. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und durch Chloroquin-haltiges Medium ersetzt. Das Calcium-Phosphat-Gemisch mit 10 µg DNA wurde auf die Zellen gegeben und für 8 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Nach 72 h Inkubation bei 37°C wurde das virenhaltige Medium abpipettiert und durch Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert. 15 ml dieses Virusstocks wurden mit Polybren einer Endkonzentration von 8 mg/ml auf 2×10^5 der zu infizierenden Zellen in eine 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben und für 8 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Polybren-haltigen Mediums wurde frisches Medium zugegeben und bei 37°C weiterkultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Antibiotika selektiert, indem 0,3 µg/ml Puromycin bei jedem Mediumwechsel zugesetzt wurden. Die resistenten Zellen wurden nach drei Wochen durch Trypsinierung vereinzelt und weiterkultiviert. Nun konnten die Zellen analysiert werden.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 ELISA

Die Insulinsekretion von isolierten Inseln sowie der Insulingehalt im Plasma transgener Mäuse wird mit Hilfe der ELISA-Methode ermittelt.

Die Insulinsekretion von isolierten Inseln wird wie folgt gemessen: Die Inseln von 8 bis 12 Wochen alten doppelt-transgenen Mäusen, die mit bzw. ohne Doxzyklin (Kontrolle) im Trinkwasser gehalten wurden, wurden präpariert und in RPMI-Medium mit einer Serumkonzentration von 10% für 48 h kultiviert. Anschließend werden pro Versuchsansatz ca. 20 Inseläquivalente für 24 h in DME-Medium kultiviert, das 2 mM Glukose und 10% FCS enthält. Als Standardgröße gilt eine Insel mit einem Durchmesser von 150 µm (Ricordi et al., 1990). 24 h später werden die Inseln zweimal mit PBS gewaschen und in Krebs-Ringer-Puffer aufgenommen, der Glukose in einer Konzentration von 2 mM enthält. Die Inseln werden für 120 min bei 37°C inkubiert. Danach werden sie 60 min bei 37°C in Krebs-Ringer-Puffer inkubiert, der entweder 2 mM oder 11 mM Glukose enthält. Die Insulinkonzentration im Überstand wird anschließend via ELISA nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

Der Insulingehalt des Plasmas transgener Mäuse wird folgendermaßen bestimmt: Die Mäuse werden für ca. 8 h gefastet, gewogen und intraperitoneal mit einer 20%igen Glukose-Lösung (2 mg Glukose/g Körpergewicht) injiziert. Das Blut wurde aus der Schwanzvene gewonnen und in heparinisierten Röhrchen gesammelt, bei 4°C, 2000x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand bis zum ELISA bei -70°C weggefroren. Der Insulingehalt im Plasma wurde vor der Glukose-Injektion (Zeitpunkt 0) sowie 15, 30, 60, 90, 120 und 150 min nach der Glukose-Injektion via ELISA nach Anleitung des Herstellers (Millipore) bestimmt.

Es handelt sich dabei um einen Zwei-Phasen-Immunoassay, der auf der direkten Sandwich-Methode basiert. Ein monoklonaler Maus-anti-Insulin-Antikörper ist bereits an den Boden der Mikroplatte gebunden. Standardlösungen von 10 µl, welche entweder 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 oder 10 µg/l Insulin enthalten, oder 10 µl der Testprobe (Doppelbestimmung) werden in die Platte pipettiert. Danach werden 80 µl eines Biotin-konjugierten Antikörpers hinzugegeben und nach 2 h durch eine Enzymlösung ersetzt, die Meerrettich-Peroxidase an die immobilisierten, biotinylierten Antikörper bindet. Nach einigen Waschschrinen entsteht bei einer Reaktion mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzin ein Farbkomplex, welcher bei 450 nm mit dem ELISA-Reader (Microplate Reader Model 550, Biorad) nach Reaktionsabbruch durch Säurezugabe gemessen wurde. Der Farbumschlag ist proportional zur Insulinkonzentration. Die Konzentration der Testprobe wird durch die Standardkurve ermittelt, die Doppelwerte gemittelt und von dem Blank befreit. Die Angaben erfolgen in ng/ml. Die Anfangskonzentration jeder Gruppe wird gleich 100% gesetzt, um so Aussagen über die Änderung innerhalb einer Gruppe treffen zu können.

2.7.2 Bestimmung der Apoptose – Caspase 3/7-Assay

Zur Messung der Apoptose wurde die Kaspaseaktivität mittels des Caspase-Glo 3/7 Assay Kits Tests (Promega) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Aktivierung der Kaspase-Kaskade ist ein integraler Bestandteil des Apoptose-Signalweges. Bei diesem Assay wird die Proteaseaktivität der Kaspasen 3 und 7 anhand des Umsatzes eines lumineszierenden Substrates Aminoluziferin ermittelt. Durch proteolytische Spaltung der Tetrapeptidsequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) des Aminoluziferin wird dieses als Substrat für die Luziferase zugänglich (vgl. Abbildung 10). Das emittierte Lumineszenzsignal ist proportional zur Kaspaseaktivität 3/7.

Zellpellets von 400 000 INS-1-Zellen wurden in 15 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1x Complete und 10 mM DTT) aufgenommen und resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis und 10 minütiger Zentrifugation bei 11100x g wurde die Proteinkonzentration unter Verwendung des Bradford-Assays bestimmt. Die Zellextrakte wurden anschließend mit Proteinpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM KCl und 5% Glycerol) zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml verdünnt. 10 µl dieses Extrakts wurden mit 10 µl des CaspaseGlo-Substrates (nach den Angaben des Herstellers) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Lumineszenz im Luminometer ermittelt.

2.7.3 Zellernte, Kernextraktion und Gesamtzellextraktion

Zur Analyse verschiedener Proteine wurden die Zellen zunächst geerntet und anschließend die Proteine extrahiert.

Nach Ablauf der Stimulations- bzw. Behandlungsdauer der Zellen eines Versuchsansatzes wurde das Medium entfernt und die Zellen auf Eis zur Ernte mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml 1x PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale mechanisch abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 16060x g und 4°C für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.7.3.1 Präparation von Kernprotein

Nach der Zellernte wurde das Pellet in 100 µl kaltem Puffer A (10 mM HEPES/KOH pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) resuspendiert. Zu dem Puffer A wurden vor Gebrauch 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 2% Nonidet P40 und 1x Protease Inhibitoren frisch dazugegeben, resuspendiert und 20 min lang inkubiert. Hierbei erfolgte alle 5 min ein mechanischer Aufschluss der Zellen, indem diese mehrmals über ein Drahtgestell gezogen wurden. Um die Zellhülle, das Zytoplasma und weitere Organellen von den Kernen zu trennen, folgte eine Zentrifugation bei 16.000x g, 4°C und 5 min. Der Überstand mit den zytoplasmatischen

Proteinen wurde abgesaugt und das Kernpellet wurde in 30 µl kaltem Puffer C (10 mM HEPES/KOH pH 7,9, 25% Glycerol, 20 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA und immer frisch dazu gegeben 0,5 mM DTT und 0,2 mM PMSF) während der 20 minütigen Inkubation auf Eis resuspendiert, somit der Aufschluss der Kerne durch mechanische Scherkräfte bewirkt. Anschließend wurden die Proben erneut bei 16000x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand mit den Kernproteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 2 µl für die Proteinmessung abgenommen (2.7.4). Um gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen, wurden die entsprechenden Volumina in der Proteinbestimmung (2.7.4) ermittelt. Nachdem die Proteinbestimmung durchgeführt war, wurden die Proben mit 2x SDS-Stoppuffer (Stock: 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 3 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol; 9% SDS; 0,05% Bromphenolblau. (Gebrauchslösung: 9 Vol. 2x SDS-Stoppuffer +1 Vol. β-Mercaptoethanol) versetzt.

2.7.3.2 Präparation von Gesamtprotein

Der Ganzzellextrakt wurde zum Nachweis von Proteinen verwendet, welche im Zytoplasma und Zellkern vorzufinden sind. Das Pellet der geernteten Zellen wurde in 100 µl kaltem Ganzzellextrakt-Puffer (10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% Triton, 0,02% NaN₃). Zu dem Puffer A wurden vor Gebrauch 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 2% Nonidet P40, 1x Protease-Inhibitoren frisch dazugegeben und resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde bei 16060x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Davon wurden 2 µl für die Proteinbestimmung abgenommen, der Rest des Überstandes wurde im Verhältnis 1:1 mit SDS-Stoppuffer versehen.

2.7.3.3 Präparation von Membranproteinen

Das Zellsediment wurde zur Lyse in 200 µl Puffer (10 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, 2 mM EDTA, 1x Protease Inhibitor) resuspendiert, auf Eis für 10 min inkubiert und zytosolische Fragmente durch Zentrifugation für 30 min bei 12000x g 4°C abgetrennt. Das Membran-Sediment wurde in 30 µl Puffer (200 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7,5, 2 mM, PMSF) vollständig resuspendiert. Zur Suspension wurden tropfenweise 30 µl einer 2% CHAPS-Lösung gegeben und gevortext. Zum Solubilisieren der Membranproteine wurde die Lösung 10 min auf Eis inkubiert und für 10 min zentrifugiert bei 12000x g 4°C. Die im Überstand enthaltenen Membranproteine wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt bzw. nach Versetzen mit Stoppuffer (1:1) im Western Blot analysiert.

2.7.4 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Dieser Assay ist eine Kombination aus Biuret-Assay und Bicinchonisäure (BCA). Zweiwertige Kupferionen

reagieren mit Protein zu einwertigen Kupferionen, welche mit zweiwertigen Kupferionen einen purpurfarbenen Farbkomplex bilden, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm kalorimetrisch detektiert werden kann. Die Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Zur Proteinbestimmung wurden 2,5 µl des Proteinextrakts mit 200 µl BCA-Lösung versetzt und in eine 96-Loch Platte pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Interpolation einer Standardkurve. Hierbei wurden BSA-Lösungen in einer Konzentration von 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml eingesetzt.

2.7.5 Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe im elektrischen Feld.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine an die anionische Substanz SDS (Natriumdodecylsulfat) gebunden, welche die Eigenladungen von Proteinen überdeckt. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide eines Proteins, so dass größere Proteine langsamer wandern als kleinere und eine Auftrennung erfolgen kann. Bei der Probenvorbereitung wurde SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Zusätzlich wurden reduzierende Thiolverbindungen wie β-Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT) dem Probenpuffer zugesetzt, um Disulfidbrücken zu spalten. Zur Auftrennung wurden die Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen, welches bei Anlegen einer Spannung die Proben siebt, indem die engporigen Maschen größere Proteine langsamer wandern lassen.

Als ein Vorteil der diskontinuierlichen Gelelektrophorese gilt eine hohe Bandenschärfe. Die Bezeichnung „diskontinuierliche Gelelektrophorese“ bezieht sich auf die unterschiedlichen pH-Werte, die unterschiedlichen Porengrößen des Trenn- und des Sammelgels sowie die Art und Konzentration der Ionen.

Um eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchzuführen, wurde ein weitporiges Sammelgel über ein engporiges 10% Trenngel in eine Minigelkammer gegossen. Zum Starten der Polymerisationsreaktion von Acrylamid und Bisacrylamid wurden zum Trenn- und Sammelgel jeweils 10%iges Ammoniumperoxidsulfat (APS) und TEMED zugegeben. Zuerst wurde das Trenngel bis 1,5 cm unterhalb der Glasplatte in eine Minigelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um das Gel an der Oberfläche gleichmäßig für 30 min aushärten zu lassen. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, stattdessen die Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben und ein Kamm

zugefügt. Waren beide Gele fest, wurde die Gummidichtung zwischen den beiden Glasplatten entfernt, die Gelkammer luftblasenfrei mit 1x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris pH 8,3, 2,5 M Glycin, 1% SDS) gefüllt und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Die entstandenen Taschen wurden mit Puffer gespült und mit den Proben sowie dem Marker beladen. Als Marker wurden gefärbte Proteine mit bekanntem Molekulargewicht („Prestained Protein Molecular Weight Marker“) verwendet. Die Gelkammer wurde an ein Spannungsgerät angeschlossen (70 V) bis die Proteinfrent sich im Sammelgel befand und auf 90 V erhöht bis sich der Marker entsprechend der Größe des zu untersuchenden Proteins weit genug aufgetrennt hatte.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Zusammensetzung des 10%igen Trenngels

4 ml	H ₂ O
3,3 ml	30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)
2,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8 100µl 10% SDS(0,4%)
200 µl	APS 10%
20 µl	TEMED

Zusammensetzung des Sammelgels

1,8 ml	H ₂ O
750 µl	30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)
350 µl	0,5 M Tris pH 6,8 30µl 10% SDS (0,4%)
30 µl	APS 10%
3 µl	TEMED

2.7.6 Western Blot von SDS-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der denaturierten Proteine wurden die Proteine im Western Blot-Verfahren vom SDS-Gel auf eine synthetische Membran übertragen und dadurch ein genaues Abbild von den aufgetrennten Proteinen des Elektrophoresemusters erhalten. Im weiteren Versuchsablauf konnte ein immunologischer Nachweis der Proteine angeschlossen werden. Das Flüssigtransfer-Verfahren in einer Blotting-Apparatur (Hoefler Scientific Instruments, San Francisco) wurde dazu angewendet. Bei einer Stromstärke von etwa 200 mA und einer Laufzeit von etwa 120 min wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm mit einer Dicke von 140 µm übertragen. Für den Transfer wurde luftblasenfrei ein „Sandwich“ aus einem Schwamm, 3 Lagen 2 mm Wattman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel, erneut 3 Lagen Wattman-Papier und einem Schwamm in die mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) befüllte Blottingapparatur gespannt. Die Membran war zu der Anoden- und das SDS-Gel zu der Kathodenseite orientiert. Die Schwämme, Wattman-Papiere und die

Nitrocellulose-Membran wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer befeuchtet. Aufgrund der aus dem SDS-resultierenden negativen Ladung und des Anlegens eines elektrischen Feldes wurden die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach Beendigung des Transfers der Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran mit 500 µl Ponceau-S-Lösung (Ponceau-S-Konzentrat, die Herstellung erfolgte gemäß den Herstellerangaben von Sigma-Aldrich, wurde mit H₂O 1:20 verdünnt) angefärbt. Einerseits kann dadurch vor der Antikörperinkubation ausgeschlossen werden, dass Luftblasen oder ungleichmäßige Proteinmengen auf der Membran das Ergebnis des Western Blots verfälschen und andererseits die vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft werden. Zum Entfärben wurde die Membran dreimal 5 min mit 1x TBS (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) bzw. TBST (TBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen vor nachfolgender Antikörperzugabe wurde die Membran entweder für mindestens 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blocking-Lösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBS bzw. TBST) inkubiert.

2.7.7 Immunzytochemischer Nachweis der Proteine

Diesem Schritt folgte die Inkubation der Membran mit dem in TBS bzw. TBST verdünnten Primärantikörper (Tabelle 4) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Danach wurde die Membran 3 x 5 min lang unter Schwenken mit TBS-Puffer gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend folgte die Inkubation der Membran mit dem in TBS verdünnten Sekundärantikörper für 2 h bei RT. Dieser Antikörper war gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran erneut 2 x 5 min lang unter Schwenken mit TBS-Puffer und einmal 5 min lang unter Schwenken mit TBST-Puffer gewaschen. Zum Nachweis des entstandenen Komplexes aus dem zu detektierenden Protein, Primär- und Sekundärantikörper wurde entweder das ECL-System (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire) oder selbsthergestelltes ECL verwendet. Bei Verwendung des ECL Systems von Amersham Biosciences wurde 1 ml der ECLplus-Gebrauchslösung (40 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B, ECLplus-Kit) gleichmäßig auf der Nitrocellulose-Membran verteilt und 5 min inkubiert. Wurde das ECL selbst hergestellt, wurden die beiden Lösungen ECL1 (100 mM Tris pH 8,5) und ECL2 (5,4 mM H₂O₂, 2,5 mM Luminol, 100 mM Tris pH 8,5, 400 µM para-Coumarinsäure (Roth)) im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und ebenfalls gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 5 min inkubiert. Das Prinzip der *Enhanced Chemoluminescence Reaction* (ECL) besteht darin, dass durch eine Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol Licht emittiert wird. Diese Chemilumineszenz kann durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Membran

wurde mit Wattman-Papier trocken getupft, unmittelbar danach wurde die durch die Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert und somit spezifische Proteinbanden anhand des mitgeführten Markers identifiziert. Die Expositionszeit wurde an die jeweilige Signalstärke angepasst.

2.8 *In vivo*-Analyse: Maus

2.8.1 Mausstämme

Für die Versuche wurden C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Die Versuchstiere wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar gezüchtet. Das Körpergewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 15-30 g, was einem Alter von 5-12 Wochen entsprach. Die Tiere wurden unter klimatisierten und keimfreien Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 60-70%; Tag/Nachtrhythmus: 12 h/12 h) in Käfigen höchstens zu viert gehalten. Während ihrer Haltung bekamen die Versuchstiere Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum.

Die Experimente und die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien der Tierschutzgenehmigung (NIH Publication #85-23 Rev. 1985) und standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. M. Frings. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt. Die behördlichen Genehmigungen für die Forschungsarbeiten lagen vor (Kreisverwaltung Homburg Az.: K 110/180-07 vom 17.12.2004, Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarland - Az.: H1 2.4.2. vom 12.12.2008 (Versuch Nr. 38/2008 /Egr) - Az.: H1 2.4.2.2 vom 15.11. 2010 (Versuch Nr. 38/2010 (Proliferation)) - Az.: H1 2.4.2.2 vom 15.11.2010 (Versuch Nr. 39/2010 (Glukosetoleranztest)) RP (Regierungspräsidium) Karlsruhe, Abt. 3 – Landwirtschaft, Ländlicher Raum, Veterinär- und Lebensmittelwesen, Karlsruhe, Az.:35-9185.81/G-20/09 vom 03.03.2009).

In jeder Gruppe standen Tiere beider Geschlechts in einem ausgewogenen Verhältnis zur Verfügung. Tiere der Doxyzyklin-Gruppe bekamen schon während der Schwangerschaft bis zum Tötungstag 0,8 g/l Doxyzyklin (Biomol) mit 0,8% Sukrose im Wasser verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde ein Zusatz von 0,8% (+D)-Sukrose im Trinkwasser verabreicht.

2.8.2 Mausmodell

Induzierbare Genexpression: Das Tetrazyklin-System

Zur Analyse von Genfunktionen *in vivo* und somit in komplexen Systemen wie z. B. der Maus ist es wünschenswert, den Expressionsverlauf eines zu untersuchenden Gens strikt

kontrollieren zu können. Um dies zu erreichen, benötigt man ein induzierbares Expressionssystem, welches sich idealerweise schnell durch ein externes Agens reversibel an- und abschalten lassen kann. Darüberhinaus sollte es im nicht-induzierten Zustand keine Expression zeigen und somit keinen Effekt auslösen. Zudem sollte das induzierende Agens keine unerwünschten Nebenwirkungen auf die Entwicklung des Organismus oder gar eine toxische Wirkung besitzen.

Das am häufigsten eingesetzte Expressionssystem ist das entwickelte Tetrazyklin-System (Gossen & Bujard, 1992). Die Basis bilden zwei regulatorische Elemente aus dem *E. coli* Tetrazyklin-Resistenz-Operon: das *Tet Repressor*-Protein (*TetR*) und die *Tet Operator*-Sequenz (*TetO*). Die *TetO*-Sequenz wird mit einem eukaryontischen Minimal-Promotor (in der Regel ein Promotor des Cytomegalovirus, PCMV) kombiniert. Das Tetrazyklin-System gibt es in den zwei Varianten: dem *Tet-off* und *Tet-on*. Bei dem ursprünglichen *Tet-off*-System wurde das *TetR*-Protein mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne des VP16-Proteins des *Herpes simplex Virus* zu dem *Tet*-gesteuerten Transaktivator (tTA) fusioniert. Der Transaktivator tTA bindet in Abwesenheit des Induktors Doxyzyklin (Dox) an das TRE und initiiert die Expression des Zielgens. In Anwesenheit von Doxyzyklin interagiert dieses mit dem Transaktivator tTA. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung innerhalb des tTA, dieses dissoziiert vom TRE ab und die Expression des Zielgens bleibt aus. Das entwickelte *Tet-on*-System wurde im Gegensatz dazu dermaßen verändert, dass die Expression des Zielgens durch die Zugabe von Doxyzyklin induziert wird. Dies wurde durch Mutation des Tet-Repressors erreicht. Als Fusionsprotein mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne des VP16-Proteins bildet es den reversen Tet-gesteuerten Transaktivator (rtTA). Dieser kann nur in Anwesenheit von Doxyzyklin an das TRE binden und die Transkription des Zielgens aktivieren (Abbildung 18).

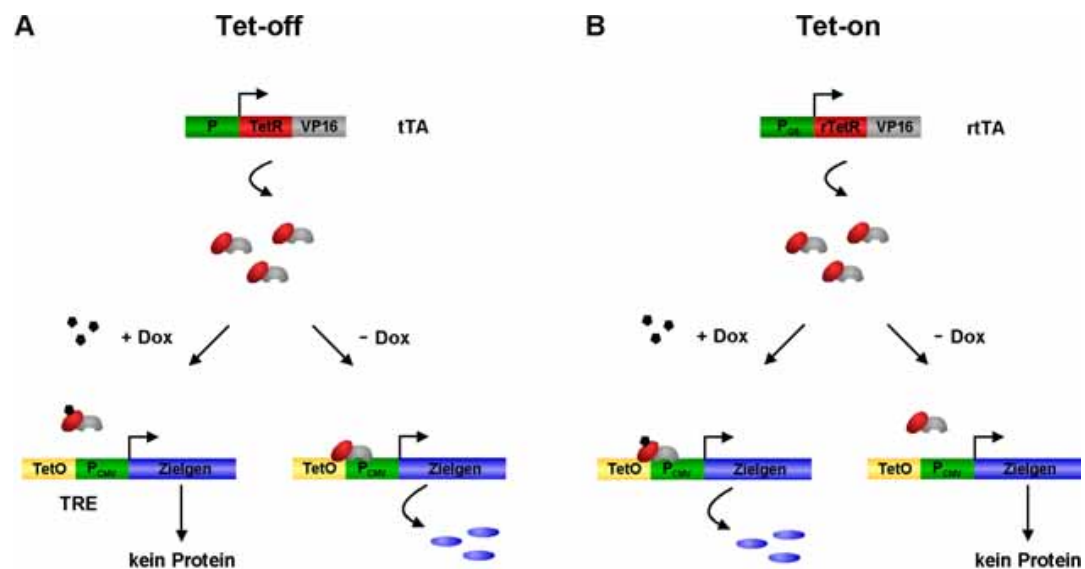


Abbildung 18: Das Tetrazyklin-System

A: Tet-off-System: Das Fusionsprotein tTA (Tetrazyklin-gesteuerte Transaktivator) wurde aus dem Tetrazyklin Repressor (TetR) und der Transkriptions-aktivierenden Domäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus generiert (HSV-VP16). Bei Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) bindet der tTA an die Tet-Operator-Sequenz (TetO). Der VP16-Anteil des tTAs aktiviert anschließend die Transkription des Zielgens. Die Zugabe von Doxycyclin hindert den tTA an der Bindung der TRE-Sequenz und folglich kann keine Expression stattfinden. B: Tet-on-System: Der reverse Tetrazyklin-gesteuerte Transaktivator (rtTA) ist ein Fusionsprotein aus dem mutierten Tetrazyklin Repressor (TetR) und der Transkriptions-aktivierenden Domäne des HSV-VP16-Proteins. Bei Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) bindet der rtTA an die Tet-Operator-Sequenz (TetO). Der VP16-Anteil des tTAs aktiviert anschließend die Transkription des Zielgens. Ohne Doxycyclin ist der rtTA nicht befähigt, an die TRE-Sequenz zu binden und folglich kann keine Expression stattfinden. Abbildung von <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2007/2348/> (2011).

Das Mausmodell diente zur Aufklärung der Funktionen von Egr-1 und Elk-1 im endokrinen Pankreas. In diesem Modell konnte die dominant-negative Mutanten von Egr-1 (Egr-1/Zn) bzw. Elk-1 (REST/Elk-1 Δ C) in den β -Zellen induzierbar exprimiert werden und es somit ermöglichen, Prozesse während der Entwicklung und im adulten Tier zu analysieren.

Zur Erstellung der Mauslinien RIP-rtTA [tetO]₇Egr-1/Zn bzw. RIP-rtTA [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C wurde der Vektor pBIG (Abbildung 72) verwendet (Gómez-Sintes et al., 2007). Der Vektor besitzt einen bidirektionalen, Tetracyclin-induzierbaren Promotor, so dass neben dem Transgen auch die Expression von β -Galaktosidase durch Tetracyclin reguliert wird. Die Pronukleus-Injektion in Ovarien von befruchteten C57BL/6-Mäusen der Transkriptionseinheit, die aus dem Plasmid pBIG/Egr-1/Zn bzw. [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C herausgeschnitten wurde (Aufreinigung durch Oliver Rössler), wurde in Heidelberg durchgeführt. Die transgenen Mäuse wurden genotypisiert und die positiven Mauslinien vermehrt.

Die RIP-rtTA-Mauslinie (Efrat et al., 1995), in der der reverse Tetracyclin-Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Insulin II-Promotors in β -Zellen des Pankreas exprimiert wird, wurde von Prof. Hussain, Johns Hopkins University, Baltimore, zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Kreuzung der Mauslinien [tetO]₇Egr-1/Zn und [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C mit den RIP-

rtTA-Mäusen durchgeführt. In den doppeltransgenen RIP-rtTA-[tetO]₇Egr-1/Zn bzw. [tetO]₇REST/EIk-1ΔC Mäuse bindet der reverse Tetracyclin-Transaktivator in Anwesenheit von Doxzyklin, eines Tetrazyklin-Derivats, an den bidirektionalen Promotor und induziert die Expression der jeweiligen Mutante und β-Galaktosidase in den β-Zellen des Pankreas. Die Herstellung der Mauslinien ist in Abbildung 72 als Schema zusammengefasst. Die modularen Strukturen von Egr-1 bzw. EIk-1 und den dominant-negativen Mutanten Egr-1/Zn bzw. REST/EIk-1ΔC ist in Abbildung 73 bzw. Abbildung 81 gezeigt.

2.8.3 Genotypisierung

Um DNA aus Mäuseschwanzbiopsien zu gewinnen, wurden diese mit 200 µl Chelex-100 haltigen Lysepuffer (Chelex-Lysepuffer: 0,5% Natrium-Lauroylsarcosin 0,1 M NaCl, 5 g Chelat-100 (Chelex-100 Resin, Biorad) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml)) versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Chelex-100 als Kationenaustauscher bindet divalente Metallionen sowie polare Zellkomponenten, die die PCR-Reaktion stören könnten (Walsh et al., 1991). Die DNA-Suspension wurde 2 min bei 16.000x g zentrifugiert, der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min bei 95°C gekocht und erneut 4 min bei 16.000x g zentrifugiert. Die gewonnene DNA wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und je 2 µl der genomischen DNA pro PCR-Ansatz verwendet.

Die Genotypen der Mäuse wurden mittels PCR-Analyse (2.5.1) bestimmt. Zum Nachweis der Egr/Zn, REST/EIk-1ΔC, RIP und β-Gal-Transgene der verwendeten Mäuse wurden die genomische DNA nun mit den spezifischen Primern (Tabelle 5) amplifiziert. Die Lage der Primer innerhalb des Vektors ist in Abbildung 14 abgebildet.

2.8.4 Dissektion des Pankreas und Isolierung von Inseln

Zur Isolierung der Inseln wurde eine veränderte Methode der Digestion mittels Injektion einer Kollagenase-Lösung in den Pankreasgang (Gotoh et al., 1987) angewendet. 4 bis 16 Wochen alte Mäuse wurden unmittelbar vor der Präparation unter oraler Anästhesie (25 mg/kg Xylazine (Rompun®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany) and 75 mg/kg Ketamine (Ketanest®, Pfizer, New York, NY, USA)) durch eine cervicale Dislokation getötet. Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter semi-sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Tier wurde an den vier Extremitäten mit Pflaster (Leukosilk® 10 mm) in Rückenlage auf einer sterilen Platte ausgestreckt fixiert. Das Abdomen wurde mittels einer medianen Laparotomie geöffnet. Um bei der Präparation keine Verletzungen zu verursachen, wurden feuchte Tupfer (Wattestäbchen) verwendet.

Die Inseln von doppelt-transgenen Mäusen werden durch retrograde Injektion einer mit 0,5% BSA und Neutralrot (0,1 mg/ml) versetzten Kollagenase-Lösung (Kollagenase P, 1 mg/ml) in

den gemeinsamen, abgeschnürten Ausführgang von Pankreas und Gallenblase unter dem Mikroskop mittels einer Polyethylene-Kanüle gewonnen und nach Zentrifugation und Handselektion (Wagner et al., 2008), (Ricordi et al., 1990) isoliert. Dazu wurde nach dem Entnehmen des mit Kollagenase-Suspension aufgeblähten Pankreas das exokrine Pankreasgewebe in ein 37°C warmes Wasserbad für 15 min verdaut, die erhaltene, heterogene Suspension abzentrifugiert (200x g, 1 min) und mit HBSS gewaschen. Nach Waschen und Aufreinigung der Inseln aus Gewebe durch mehrere Zentrifugationsschritte (200x g, 1 min), wurde die Suspension auf Petrischalen in 5 ml HBSS-Lösung gegeben und die lebend-rotgefärbten Inseln in mehreren Schritten durch Picken unter dem Mikroskop weiter aufgereinigt. Die handgepickten Inseln wurden in HBSS gesammelt und je nach anschließender Untersuchungen in spezifischem Puffer geerntet .

Zur Separierung der Inseln in Einzelzellen wurden die Inseln in einer divalent-Kationen (Ca^{2+})-freien Lösung (DPBS) aufgenommen, um durch Zugabe von Trypsin (1:10) für 2 min bei 37°C eine Verdauungsreaktion zu initiieren. RPMI1640 (0,1 mg/ml) Medium stoppte den enzymatischen Verdau. Die Zellen wurden anschließend für weitere biochemische Anwendungen (z. B. ELISA) als hängende Tropfen (50 Inseln in ca. 200 μl) auf Zellkulturschalen ausplattiert und nach 2-3 h durch Zugabe von 2-3 ml RPMI kultiviert.

2.8.5 Western Blot zum Nachweis der Expression der Transgene

Zu Identifikation der Egr-1/Zn bzw. REST/Elk-1 Δ C-Proteinexpression im Pankreas Doxyzyklin-behandelter Mäuse wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Als Kontrolle dienten Sukrose-behandelte Mäuse.

Zur Extraktion der Gesamtproteinfraktion der Inseln wurden die Proben in dem Lysepuffer RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 1% Igepal (Nonidet P40), 0,1 mM PMSF, frisch dazu Proteaseinhibitor-Cocktail (40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 25 x Complete)) versetzt. Das in RIPA-Puffer gelöste Pellet wurde für 30 min auf Eis inkubiert und für weitere 30 min bei 4°C und 16000x g zentrifugiert. Der Protein-enthaltende Überstand wurde abgenommen und die Konzentration bestimmt (2.7.4). Mindestens 30 μg Protein wurden auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und mit einem M2 *monoclonal antibody*, welcher gegen das im exprimierten Egr-1/Zn bzw. REST/Elk-1 Δ C Protein enthaltende FLAG-Epitop gerichtet ist, immunochemisch nachgewiesen. Das erhaltende Signal wurde mit dem ERK2 oder GAPDH-Signal normalisiert und somit die Auftragung ungleicher Proteinmengen ausgeschlossen.

2.8.6 Messung /Bestimmung der β -Zell-Fläche

Die Quantifizierung der β -Zellfläche wurde anhand HE-gefärbter Paraffinschnitte des Pankreas mit einem BZ-8000- Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan) durchgeführt. Über 400 Serienschnitte mit einer Dicke von 5 μm von jedem Pankreas wurden präpariert und jeder 6. Schnitt bzw. 24. Schnitte (entspricht einem Abstand von 120 μm) gefärbt und die Zellfläche sowie die darin enthaltene Inselfläche in mm^2 bestimmt. Der prozentuale Anteil der Inselfläche an der Gesamtfläche des Pankreas wurde berechnet, indem die Inselfläche durch die gesamte Fläche des Pankreas geteilt wurde. Vergleich man die durchschnittliche Inselfläche, den prozentualen Anteil von Inselfläche an der Gesamtfläche und die Anzahl an Inseln pro mm^2 , so wurden die Änderungen der Inselkonstitution deutlich. Die Schnitte wurden in 4% Paraformaldehyd für 30 min fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Mehr als 400 Schnitte mit einer Dicke von 5 μm wurden präpariert und jeder 6. Schnitt gefärbt und ausgewertet (Hussain et al., 2006).

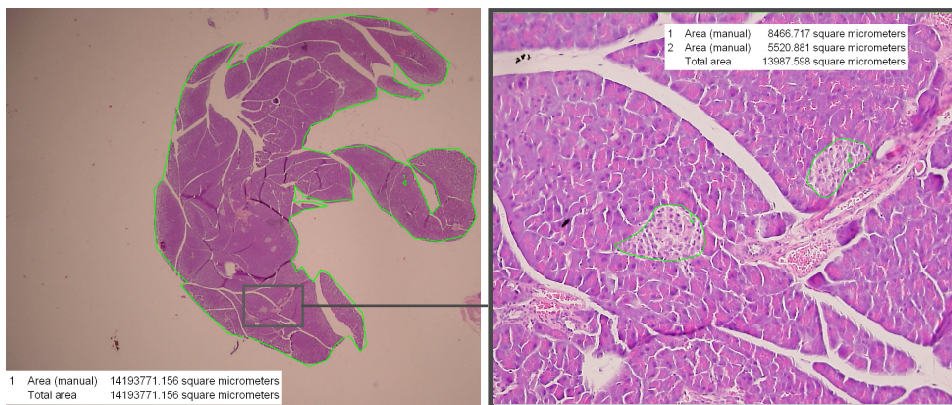


Abbildung 19: HE-gefärbter Pankreas/Insel

Querschnitt durch einen in Paraffin eingebetteten HE-gefärbten Pankreas. Bestimmung der Pankreasfläche (links) und darin befindliche Inselfläche (x20 Objektiv, vergrößerter Ausschnitt, rechts) in mm^2 .

2.8.7 Histologie und Immunohistochemie

Die Pankreaspräparationen wurden für lichtmikroskopische Untersuchungen am Ende der jeweiligen Versuchsreihen abhängig von der anschließenden Analyse entweder für Kryoschnitte in flüssigem Stickstoff Schock gefroren oder für Paraffinschnitte in 4% Formaldehyd fixiert.

2.8.7.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die Proben wurden in Einbettkassetten 48 h in Formaldehyd 4% gelagert und danach zwei Stunden mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend durchliefen die Proben eine aufsteigende Alkoholreihe: ein Durchgang à 60 min in 70% Alkohol, ein Durchgang in 80% Alkohol, ein Durchgang in 90% Alkohol und drei Durchgänge in 100% Alkohol. Danach wurden die Proben viermal in Xylol gegeben. Anschließend wurden sie in Paraffin

eingebettet. Es wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica SM2000R) 5 µm-dicke Serienschnitten angefertigt und auf Objektträgern (Objektträger, ca. 76x26 mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) fixiert.

Isolierte, handgepickte Inseln wurden in 100 µl HepatoQuick, 50 µl Citratplasma, 10 µl 10% CaCl₂ nach Aushärtung bei 37°C für 20 min gesammelt und nach Lagerung in Formaldehyd wie oben beschrieben in Paraffin eingebettet. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und jeder sechste Schnitt anschließend für die Routinehistologie gemäß Standardprotokoll mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Dabei färbt Hämatoxylin alle sauren/basophilen Strukturen blau an (DNA, Zellkern), während Eosin alle basischen/acidophilen Strukturen (Zellplasmaproteine) markiert. Die Auswertung erfolgte an einem Olympus BX 60-Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc). Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die in Paraffinwachs gebetteten Gewebeschnitte im Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100–70% Ethanol) bewässert. Nach einmaligem Waschen in Aqua_{dest.} wurden endogene Peroxidasen mit 3% H₂O₂ geblockt. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte des Weiteren in der Mikrowelle für 10 min bei 600 W in Citratpuffer (pH 6) inkubiert und anschließend nach Waschschrinen mit Aqua_{dest.} und PBS mit dreiprozentigem Ziegennormalserum für 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte zuerst mit den Primärantikörpern und dann mit dem entsprechenden Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Alle Schnitte wurden anschließend mit dem Substrat, einem aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) inkubiert. Dieses Chromogen kann mittels Lichtmikroskopie visualisiert werden. Die Zellkerne wurden mittels zweimaliger Hämalaun-Gegenfärbung sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert und eingedeckt. Die Auswertung solch gefärbter Histologieschnitte erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc, x40 Objektiv bei 400-facher Vergrößerung).

Die Schnitte wurden auf Veränderungen in der pankreatischen Proteinexpression untersucht, welche anhand der Anzahl an gefärbten Inselzellen quantifiziert wurde. Nach Bestimmung der Gesamtzahl sämtlicher Zellen einer Insel anhand der Zellkerne wurde die Anzahl an Zellen erfasst, deren Immunfärbung positiv war. Die positiv gefärbten Zellen wurden pro Insel und pro Schnitt ausgewertet. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen einer Insel wurde zur Gesamtanzahl in Relation gesetzt und als prozentualer Anteil wiedergegeben. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden mindestens jeweils 20 Schnitte von ausgewählten Kontroll-

Tieren und von Doxzyklin-vorbehandelten Tieren analysiert. Dabei wurden mindestens 35 Inseln bei einer 40-fachen Vergrößerung analysiert.

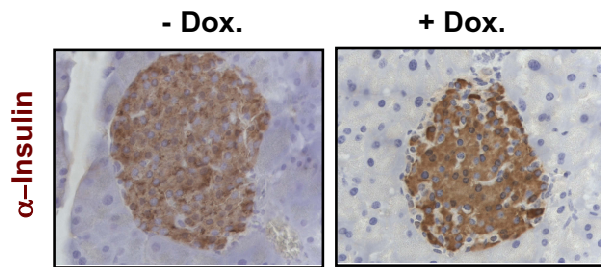


Abbildung 20: Immunfärbung Paraffin

Insulin-Immunhistochemie eines Kontroll-Pankreas sowie Pankreas einer Doxzyklin-induzierten Maus, Vergrößerung x400.

2.8.7.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Zur besonderen histochemischen und immunzytochemischen Färbung wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die Proben wurden in TissueTek eingebettet und zur immunhistologischen Untersuchung in Flüssigstickstoff eingefroren. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Durchführung der entsprechenden Untersuchungen bei -80°C gelagert. Zum Schneiden der Proben wurden diese auf einen Probenträger aufgefroren und mittels eines Gefriermikrotoms $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, welche auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden direkt bei 4°C für 5 sec in Aceton fixiert, 1 h getrocknet und für 5 min in 4% Formalin fixiert. Nach Waschen in $\text{Aqua}_{\text{dest}}$ wurden, wie oben beschrieben, die endogenen Peroxidasen geblockt und anschließend dem in 2.8.7.1 beschriebenen Protokoll gefolgt.

Die histochemischen und immunzytochemischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Menger vom Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum Homburg/Saar, durchgeführt.

2.8.8 Blutentnahme

Für den ELISA wurde den Mäusen zu dem jeweiligen Zeitpunkt von der Schwanzvene bis zu $40\ \mu\text{l}$ Blut in heparinisierte Kapillaren zur Gewinnung von Plasma/Serum durch Zentrifugation entnommen. Für den IPTGG genügten $5\ \mu\text{l}$ Vollblut von der Schwanzvene, welches direkt auf den Teststreifen aufgetragen wurde.

2.8.9 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (IPGTT)

Zur Durchführung des Glukosetoleranztests wurden die Mäuse einer Hungerperiode von 6-16 h ausgesetzt und das Körpergewicht bestimmt. Danach wurde den Tieren intraperitoneal

D-Glukose injiziert (2 mg/g Körpergewicht). Die Glukosekonzentration im Blut wurde mit einem Glucometer (Accu-Chek® Aviva) festgestellt. Blut wird aus der Schwanzvene gewonnen und die Glukosekonzentration im Blut vor der Injektion und 15, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min nach der Injektion bestimmt.

2.8.10 X-Gal -Histochemie

Die künstliche Substanz X-Gal wurde zur qualitativen Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase (durch das LacZ-Gen kodiert) verwendet. Als Marker für die Doxyzyklin-induzierte Genexpression wurde die Aktivität der exprimierten β -Galaktosidase durch X-Gal-Histochemie sichtbar gemacht. Das Substrat X-Gal wird durch das Enzym zu Galaktose und dem blauen Chromogen 5-bromo-4-chloro-Indoxyl hydrolysiert. Die Blaufärbung dient somit als Indikator der hergestellten β -Galaktosidase. Aus diesem Grund wurden Kryoschnitte von isolierten Pankreata oder kultivierten, isolierten Inseln in PBS gewaschen und für 10 min in 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und bei 37°C mit einer PBS-Lösung gefärbt, die 5 mM Kaliumferricyanid, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 mM MgCl₂ in PBS und 1 mg/ml 4-Cl-5-Br-3-indolyl- β -galactosidase (X-Gal) enthält. X-Gal (40 mg/mL) wurde in DMF (Dimethylformamide) angesetzt und dann im Reaktionsmix gelöst. Die so behandelten Zellen wurden für 1-6 h bei 37°C inkubiert.

Zur immunhistochemischen Darstellung der Doxyzyklin-induzierten β -Galaktosidase Genexpression wurden zusätzlich aus den nach Versuchsende eingefrorenen Gewebeproben 5 μ m dicke Gefrierschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden, wie oben beschrieben, gewaschen, fixiert und mit dem Substrat X-Gal in einer feuchten Kammer für mindestens 1 h inkubiert. Nach Waschen mit Aqua_{dest.} wurden die Schnitte in „Kaisers Glyceringelatine“ eingedeckt. Mit einem Olympus BX60 Lichtmikroskop wurden die β -Galaktosidase-positive Zellen der Schnitte von ausgewählten Kontroll-Tieren und von Doxyzyklin-vorbehandelten Tieren analysiert.

2.8.11 Zell-Proliferation-Assay

Die DNA-Syntheserate kann indirekt als Maß der Zellproliferation herangezogen werden. Die Proliferation der β -Zellen von 4 und 15 Wochen alten, doppelt-transgenen Mäusen wurde durch die intraperitoneale Injektion des Pyrimidin-Analogons 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) detektiert. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Inkorporation von 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (Calbiochem) anstelle von Thymidin in die genomische DNA proliferierender Zellen.

Vor der Injektion wurden die Tiere gewogen, um die individuelle Dosis für jedes Tier zu ermitteln. Jeder Maus wurde 120 µg BrdU/g Körpergewicht, in einer auf Körpertemperatur vorgewärmten isotonischen Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelöst, injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung betrug 10 mg/ml BrdU. Eine Maus mit einem Körpergewicht von 25 g bekam somit z. B. eine Injektion von 250 µl Injektionslösung. Der Eingriff erfolgte ohne Anästhesie, da die Äthernarkose für die Tiere belastender als die Injektion selbst ist. Somit wurde den Tieren unnötiger Stress erspart. Zur Proliferationsanalyse wurden die Mäuse 6 h nach BrdU-Gabe unter Äthernarkose durch Dekapitierung getötet, die Pankreata sofort entnommen und für 48 h in frisch hergestelltem Paraformaldehyd 4% in PBS fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5µM-dicke Schnitte hergestellt. Die BrdU-Markierung wurde immunzytochemisch mit einem sekundären goat-anti-mouse IgG-Antikörper nachgewiesen (Oncogene), der Peroxidase gekoppelt ist. DAB dient als Chromogen. Jeder 6. Schnitt wurde einer immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von BrdU unterzogen. Zellkerne wurden mit H&E sichtbar gemacht. Nach Blockieren der endogenen Peroxidase wurde die DNA denaturiert, wodurch die Detektion von BrdU durch den entsprechenden Antikörper möglich wurde. Dazu wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C in 4 N HCl inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS (3x10 min) folgte eine Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen im Gewebe und anschließend wurde dem in 2.8.7.1 beschriebenen Protokoll gefolgt.

Statistik

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung kamen die Programme SigmaStat und Sigma Plot 11 (Jandel Coporation, San Rafael, CA, USA) zur Anwendung. Die statistische Analyse wurde auf der Basis des *two-tailed student's t-test* durchgeführt. Eine statistische Wahrscheinlichkeit wurde als signifikant deklariert, wenn $P < 0,05$ und wie folgt dargestellt: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Auf diese Darstellung wurde in den Reporteragen-Analysen aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, da diese Ergebnisse stets eine Signifikanz aufwiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Signaltransduktion von Glukose in Insulinoma-Zellen

3.1.1 Regulation der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen

3.1.1.1 Regulation der Insulin-Promotoraktivität in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen

Die Erhöhung der Glukosekonzentration in β -Zellen sowie Insulinoma-Zellen reguliert die Gentranskription, einschließlich der Insulin-Gentranskription (Goodison et al., 1992).

Zur Analyse der Insulin-Promotoraktivität wurde ein Insulin-Promotor/Luziferase-Reportergen in das Chromatin von INS-1 Insulinoma-Zellen mittels eines lentiviralen Gentransfers integriert. Eine schematische Darstellung des integrierten Provirus wird in Abbildung 21A gezeigt. Die infizierten Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) und im Anschluss mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Es wurden zytoplasmatische Extrakte hergestellt und die Luziferase-Aktivitäten gemessen. Wie Abbildung 21B zeigt, erhöhte die Stimulation mit Glukose die Transkription des Insulin-Promotor/Luziferase-Reportergens.

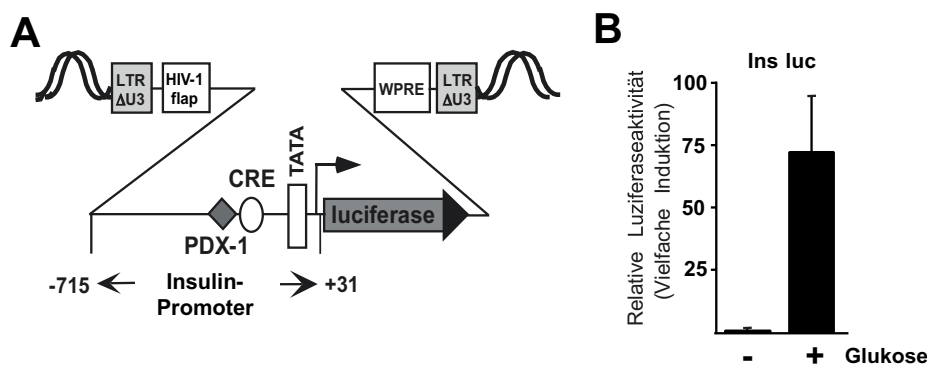


Abbildung 21: Glukose-Stimulation erhöht die Insulin-Promotoraktivität in INS-1-Zellen

A: Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für ein Insulin-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert. Das zyklische AMP Response-Element (CRE) und die Bindungsstelle für Pdx-1 sind eingezeichnet. Die U3 Region im 5' LTR des Transfervektors wurde deletiert. Das *woodchuck hepatitis-virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) und das *HIV-flap element* sind eingezeichnet. B: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, welcher für ein Insulin-Promotor/Luziferase-Reportergens kodiert. Die Zellen wurden für 24 h mit 2 mM Glukose im Medium inkubiert und anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten gemessen. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.2 AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1 Insulinoma-Zellen

Es wurde gezeigt, dass bei Glukose-Stimulierung bevorzugt die Gentranskription solcher Gene aktiviert wird, die durch den Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivatorprotein-1) reguliert wird (Glaser et al., 2006). Um die AP-1 regulierte Transkription zu messen, wurde ein

Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen mittels eines lentiviralen Gentransfers in das Chromatin von INS-1 Insulinoma-Zellen eingebracht. So war sichergestellt, dass das Reporter gen in einer nukleosomalen Struktur verpackt ist. Der Promotor der menschlichen Kollagenase enthält eine TRE/AP-1-Bindestelle und wurde daher häufig zur Untersuchung der AP-1 Aktivitäten verwendet (Angel et al., 1987), (Steinmüller et al., 2001). Eine schematische Darstellung des integrierten Provirus, welcher für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert, sowie des Provirus mit der mutierten TRE-Sequenz im Kollagenase-Promotor, ist in Abbildung 22 dargestellt. INS-1-Zellen, die mit einem Lentivirus infiziert wurden, der für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert, wurden für 48 h mit Glukose (11 oder 25 mM) stimuliert. Abbildung 22B zeigt, dass die Stimulation mit Glukose die AP-1 Aktivität erhöhte. Die Aktivierung der Reporter gen-Transkription wurde um das 10-fache (Stimulation mit 11 mM Glukose) oder 14-fache (Stimulation mit 25 mM Glukose) angeregt. Trotz einiger experimenteller Varianten in der Induktionsstärke der AP-1-vermittelten Transkription zeigen diese Ergebnisse, dass eine Stimulation mit Glukose das genetische Programm der INS-1-Zellen beeinflusst, indem es Gene aktiviert, die durch den Transkriptionsfaktor AP-1 kontrolliert werden. Um die Bedeutung der TRE-Sequenz innerhalb des Kollagenase-Promotors aufzuzeigen und zu bestimmen, wurde die TRE Sequenz 5'-TGAGTCA-3' zu 5'-TGATAGT-3' wie in (Ayala et al., 2002) beschrieben, mutiert. Abbildung 22B zeigt, dass die Transkription des Reporter gens durch Glukose signifikant reduziert wurde, wenn das TRE mutiert vorlag. Aus diesem Experiment ist zu schließen, dass das *TPA responsible element* (TRE) innerhalb des Kollagenase-Promotors als Glukose-responsives Element dient. Zur weiteren Kontrolle wurden HepG2 Hepatoma-Zellen mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert und anschließend mit dem Phorbol ester TPA stimuliert. TPA aktiviert irreversibel die Proteinkinase C. Eine Stimulation mit TPA erhöhte die AP-1 Aktivität in HepG2 Zellen stark (Steinmüller et al., 2001). Die Luziferaseaktivität wurde 24 h nach Stimulation gemessen. Wie in Abbildung 22D zu sehen ist, wurde die Transkription des im Chromatin integrierten AP-1-responsiven Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gens durch TPA um das 26-fache gesteigert.

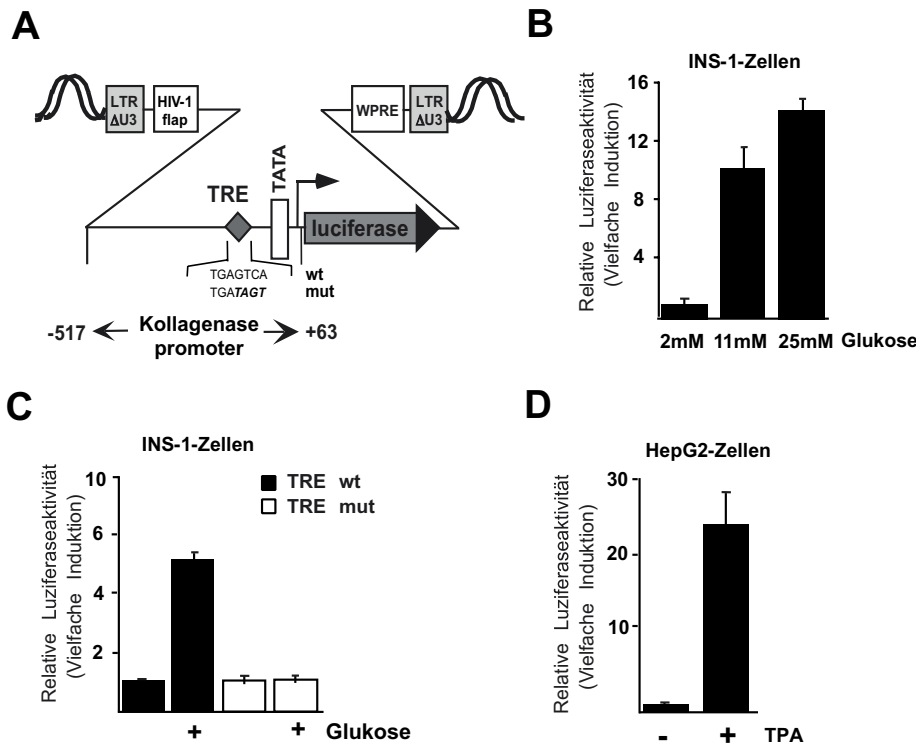


Abbildung 22: Glukose-Stimulation erhöht die AP1-Aktivität in INS-1 Insulinoma-Zellen

A: Schematische Darstellung des integrierten Provirus kodierend für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen. Die Promotorelemente wurden upstream des Luziferase-Reportergens eingefügt. Die Lage und Reihenfolge des Wildtyp und mutierten Phorbol 12-O-Tetradecanoate-13-Acetate (TPA)-responsive Element (TRE) sind gezeigt. B: INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert. Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und mit Glukose (11 und 25 mM) für 48 h behandelt. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. C: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit rekombinantem Virus infiziert, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen mit einem intakten oder einem mutierten TRE kodiert. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten ermittelt. D: HepG2 Hepatoma Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert, infiziert. Die Zellen wurden für 24 h Serum-reduziert und mit TPA (50 ng/ml) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen wurde eine Zeit- und Konzentrationsreihe der Glukosestimulierung erstellt. INS-1-Zellen wurden mittels lentiviralem Gentransfer mit einem Lentivirus infiziert, der für das Kollagenase/Luziferase-Reportergen kodiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen für 24 h mit 2 mM Glukose inkubiert und anschließend mit 11 mM bzw. 25 mM Glukose für 24 bzw. 48 h stimuliert. Eine deutliche Stimulierung wurde mit 11 mM Glukose für 48 h erreicht (Abbildung 23A). Um eine Stressinduktion und mögliche Folgekaskaden während der Versuchsdurchführung auszuschließen, wurde zusätzlich die Kaspaseaktivität der INS-1-Zellen im serumfreien, Glukose-reduzierten Stimulationsmedium bestimmt. Dazu wurde die Kaspaseaktivität bei der Glukosereduktion in 0% FCS-haltigem Medium, mit 2 mM Glukose versetzt, ermittelt und mit

der von INS-1-Zellen in Kulturmedium (10% FCS, 11 mM Glukose) verglichen (Abbildung 23B). Die allgemeine Kaspaseaktivität im serumfreien, Glukose-reduzierten Medium fiel, wie in Abbildung 23B zu sehen ist, auch ohne weitere Zusätze mit einer eineinhalb-fachen Induktion sehr gering aus. Die optimalen Zeit- und Konzentrations-Parameter der Glukosestimulierung sowie die Zusammensetzung des Stimulationsmediums unter physiologischen Aspekten wurden für alle weiteren Versuche in INS-1-Zellen, wenn nicht anders beschrieben, festgelegt: INS-1-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium mit 0,25% BSA Glukose-reduziert (2 mM Glukose) und anschließend mit 11 mM Glukose für 48 h stimuliert.

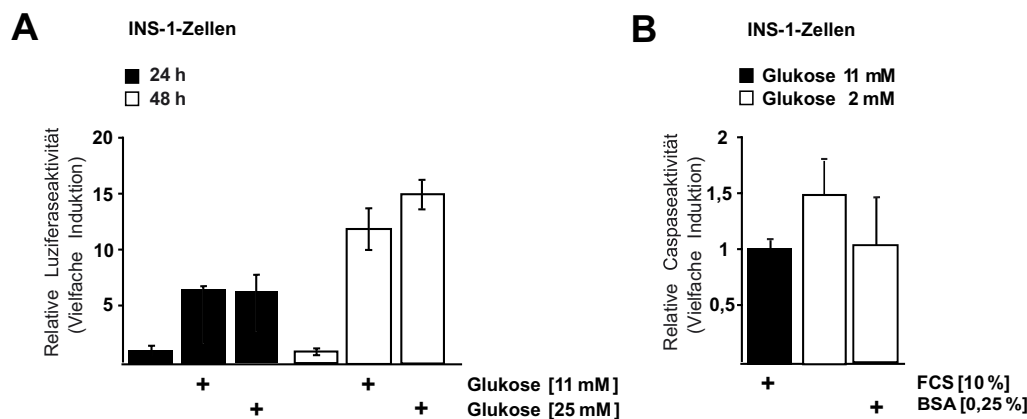


Abbildung 23: Bestimmung der optimalen Stimulationsbedingungen

A: INS-1 Insulinoma wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für das Kollagenase/Luziferase-Reportergen kodiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen für 24 h in serumfreiem Medium (2 mM Glukose) Glukose-reduziert und anschließend, wie angezeigt mit 11 bzw. 25 mM Glukose für 24 bzw. 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität gemessen. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. B: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden für 24 h in Medium mit 2 mM Glukose bzw. zusätzlich 0,25% BSA Glukose-reduziert. Als Kontrolle dienten INS-1 Insulinoma-Zellen, welche in RPMI Kultivierungsmedium (11 mM Glukose, 10% FCS) gehalten wurden. Zellextrakte wurden präpariert und die Kaspaseaktivität gemessen. Die Kaspaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.3 Die Steigerung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen benötigt L-Typ Ca^{2+} - Kanäle sowie eine erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration

Glukose induziert durch die Öffnung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle einen Calcium (Ca^{2+})-Einstrom in die β -Zellen. Um die Beteiligung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Rahmen der Glukose-induzierten Hochregulierung der AP-1-Aktivität zu überprüfen, wurden die INS-1-Zellen mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker Nifedipin vorinkubiert. Abbildung 25A zeigt, dass die AP-1 Aktivität in Nifedipin-behandelten Zellen erheblich reduziert wurde. Dieser Befund zeigt, dass die Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zur Verknüpfung der Glukose-Stimulation mit der verstärkten AP-1 Aktivität erforderlich ist. Zur Bekräftigung dieses Sachverhaltes wurden die

Zellen mit einem weiteren L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker, Verapamil, vorinkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit den L-Typ- Ca^{2+} -Aktivatoren KCl/ FPL stimuliert. KCl sowie FPL depolarisieren die Zellmembran und induzieren somit einen Ca^{2+} -Einstrom über die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle. Die Kollagenase-Reportergenaktivität wurde durch beide Stimuli deutlich induziert. Die Aktivierung wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit Verapamil gehemmt (Abbildung 24B, C).

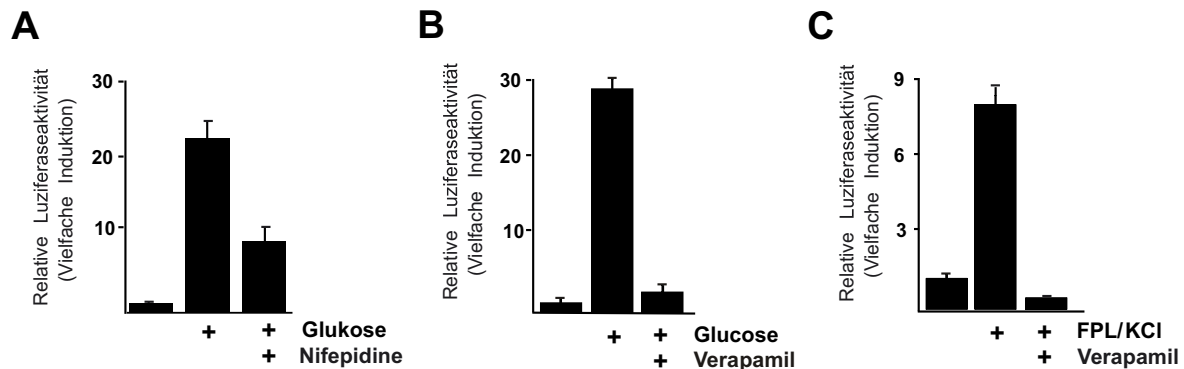


Abbildung 24: Glukose-regulierte Gentranskription in INS-1-Zellen bedarf der Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen

INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert (Abbildung 22A), für 24 h in serumfreiem Medium Glukose-reduziert und entweder mit Glukose (11 mM) für 48 h (A, B) oder mit KCl (25 mM)/FPL (2,5 μM) für 24 h (B) stimuliert. Zellen wurden zusätzlich in An- oder Abwesenheit von Nifedipin (50 μM) (A) oder Verapamil (50 μM) (B, C), wie angezeigt, analysiert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration normiert wurde.

Die Rolle einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration für die Signalkaskade in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen wurde anhand der Expression des Ca^{2+} -Bindeprotein Parvalbumin (PV) analysiert. Abbildung 25A zeigt die modulare Struktur des PVmCherry Fusionsprotein. Das Protein besitzt am N-Terminus ein nukleares Exportsignal (NES) (Pusl et al., 2002). Abbildung 25B zeigt, dass sowohl mCherry als auch NES-PVmCherry in INS-1-Zellen nach lentiviraler Infektion exprimiert werden: Das NES-markierte Parvalbumin-mCherry Fusionsprotein befand sich im Zytosol, während mCherry im Zellkern und Zytosol zu detektieren war (Abbildung 25C). Die Pufferung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mittels der Parvalbumin-Expression im Zytosol reduzierte die erhöhte AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen deutlich (Abbildung 25D). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration für die verstärkte AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen notwendig ist.

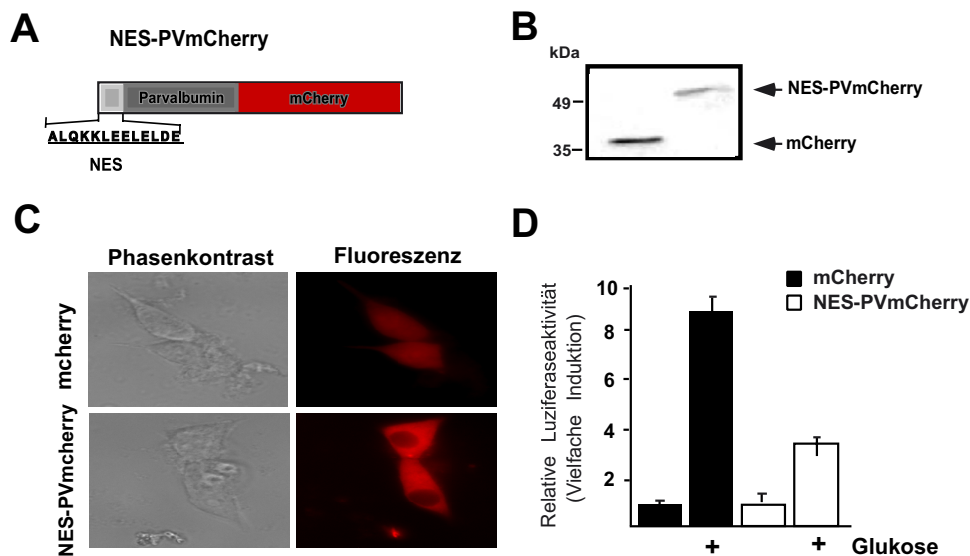


Abbildung 25: Stimulation der AP-1-Aktivität in Glukose-behandelten INS-1 erfordert die Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol

A: Schematische Darstellung der NES-PVmCherry Fusionsprotein. B: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert wurden, der für NES-PVmCherry bzw. für mCherry kodierte. Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen mCherry durchgeführt. Molekulare Marker in kDa sind auf der linken Seite angezeigt. C: Phasenkontrast und Fluoreszenz Bilder von INS-1-Zellen, die mit NES-PVmCherry (unten) oder mCherry (oben) kodierendem Virus infiziert wurden. D: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit ein Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodierte sowie einem Lentivirus, der für NES-PVmCherry kodierte, doppelt infiziert. Zur Kontrolle dienten Zellen, welche mit einem Lentivirus doppelt infiziert wurden, der für mCherry kodierte. Die Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium Glukose-reduziert (2 mM) und mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.4 Aktivierung von Raf und ERK1/2 ist für die Erhöhung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1 Insulinoma-Zellen unerlässlich

Die Stimulierung von β -Zellen mit Glukose führt durch die Signalweiterleitung des *second messenger* Ca^{2+} zur Aktivierung des ERK-Signalwegs (Frödin et al., 1995) (Arnette et al., 2003). Bei ERK1/2 (extrazellulär Signal-regulierten Kinase) handelt es sich um eine Mitogen-aktivierte Phospho-Kinase (MAP), die durch die MAP-Kinase-Kinase MEK aktiviert werden kann. Die MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-spezifische Kinasen und regulieren die Aktivität von AP-1 Faktoren (Barchowsky et al., 2000).

Um die Rolle von ERK1/2 bei der Glukose-induzierten AP-1 Aktivierung zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt: Erstens wurde Raf, eine MAP Kinase-Kinase-Kinase, durch Expression einer Spliceform (DA-Raf1) gehemmt. Zweitens wurden INS-1-Zellen mit PD98059 vorinkubiert. Dabei handelt es sich um eine Substanz, welche die Phosphorylierung von der MAP-Kinase-Kinase MEK durch Raf hemmt (Alessi et al., 1995) (Abbildung 26, oben). Abbildung 12A zeigt den modularen Aufbau der DA-Raf1, eine Spleiß-Isoform von A-Raf, welche die Funktion eines Antagonisten des Ras/Raf-ERK1/2

Signalweges ausübt (Yokoyama et al., 2007). Der Mutante fehlt die Kinasedomäne. Die zellulären Proteine von Kontroll-infizierten INS-1-Zellen oder Zellen, welche mit einem Virus infiziert waren, der für DA-Raf1 kodiert, wurden mittels SDS-PAGE fraktioniert. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen das die Myc-Epitop gerichtet ist, nachgewiesen (Abbildung 26B). Im Weiteren wurde die funktionelle Bedeutung der DA-Raf1-Expression untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von DA-Raf1 die erhöhte AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen deutlich reduzierte (Abbildung 26C). Darüber hinaus blockierte eine Vorinkubation mit PD98059 effizient die Erhöhung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen (Abbildung 26D). Aus diesen Daten ist zu schließen, dass die Aktivierung von ERK1/2 ein wichtiges Bindeglied in der Kontrolle der AP-1 Aktivierung infolge einer Glukosebehandlung ist.

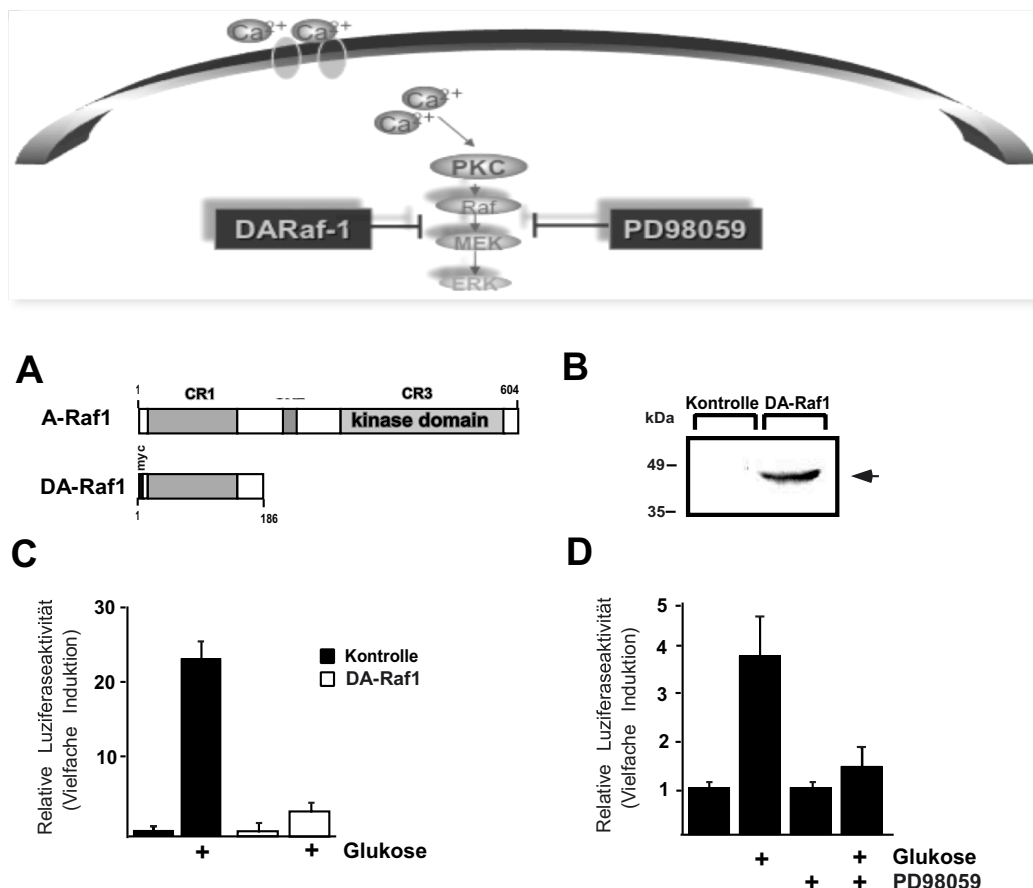


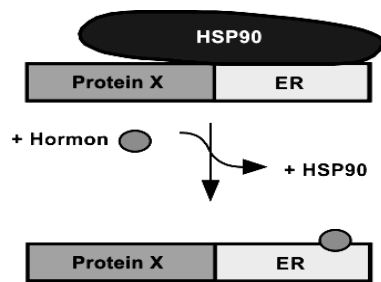
Abbildung 26: Essentielle Rolle von Raf und ERK für die Regulierung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1 β -Zellen des Pankreas

Oben: Aktivierung von ERK und inhibitorische Angriffspunkte: Ca^{2+} kann nach Einstrom in die Zelle die Proteinkinase C aktivieren, welche wiederum die MAPK Kinase Kinase Raf aktiviert. Aktiviertes Raf induziert folglich den ERK-Signalweg. Mögliche Angriffspunkte zur Inhibition dieses MAPK-Signalweges sind eingezeichnet: DA-Raf-1, eine dominant-negativ Mutante von Raf und der pharmakologische MEK-Inhibitor PD98059. A: Modularer Aufbau von A-Raf und der DA-Raf1. B: Expression von DA-Raf1 in lentiviral-infizierten INS-1 wurde mit einem Antikörper gegen das N-

terminale Myc-Tag detektiert. Molekularer Marker (kDa) ist auf der linken Seite angezeigt. C: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren, welche für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen sowie für ein DA-Raf1 kodieren, doppelt infiziert. Als Kontrolle wurden INS-1-Zellen präpariert, die mit lentiviralem Vektor pFUW (Kontrolle) enthaltenen Viren infiziert waren. Die Zellen wurden nach Glukose-Reduktion für 48 h mit Glukose (11 mM) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. D: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert, infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von PD98059 (50 μ M) für 1 h kultiviert und anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.5 Gezielte Aktivierung des ERK1/2 Signalweges in INS-1-Zellen durch Expression eines Δ B-Raf/Östrogen-Rezeptor Fusionsproteins

Aus den vorangehenden Experimenten war deutlich, dass die Aktivierung von ERK1/2 eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade einnimmt, welche die Glukose-Stimulation mit der verstärkten AP-1-vermittelten Gentranskription verknüpft. Um den ERK1/2-Signalweg in INS-1-Zellen direkt zu aktivieren, wurden INS-1-Zellen generiert, welche eine aktivierbare Form von B-Raf, das Δ B-Raf/ER-Fusionsprotein, stabil exprimierten. Die modulare Struktur von B-Raf und Δ B-Raf:ER ist in Abbildung 27A schematisch dargestellt. B-Raf enthält drei funktionale Domänen (CR1, CR2 und CR3). CR1 ist eine Cystein-reiche Region und dient als Bindestelle für aktiviertes Ras (Ras-GTP) der Zellmembran. CR2 ist reich an Serin und Threonin-Resten und reguliert negativ die biologische Aktivität der katalytischen Domäne. CR3 umfasst die Protein-Kinase-Domäne. Raf wird durch eine N-terminale Ras-Bindung und zusätzliche De- bzw. Phosphorylierungen aktiviert. Durch eine Punktmutation in der Bindedomäne (G525R) liegt Raf konstitutiv aktiv vor und kann ERK direkt aktivieren. Die katalytische Domäne von B-Raf wurde als Fusionsprotein mit der Ligand-Bindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) exprimiert, damit die Proteinkinase in Abwesenheit des Hormons in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Das Hitzeschockprotein HSP90 blockiert durch sterische Wechselwirkung die Kinaseaktivität. Die Zugabe des Hormons führt zu einer Verdrängung des HSP90 und zur Aktivierung der B-Raf-Aktivität (Thiel et al., 2009) (siehe Abbildung 27). Durch die Verwendung der Östrogenrezeptor-Mutante, ER^{Tamoxifen Mutant}, konnte der synthetische Ligand 4OHT zur Induktion verwendet werden. Das Fusionsprotein agiert somit als MAP-Kinase-Aktivator. Die Expression des Δ B-Raf:ERTM-Systems ermöglichte eine direkte Aktivierung der Raf-Kinase und die Untersuchung der Rolle von ERK.

**Abbildung 27: Funktionsweise eines Hormonrezeptorkomplex-Fusionsproteins**

Das Hitzeschockprotein HSP90 maskiert durch sterische Wechselwirkung die Aktivität des Proteins X. Nach Zugabe des spezifischen Hormons bindet dieses an seinen Rezeptor, den modifizierten Östrogenrezeptor (ER), wodurch das HSP90 dissoziiert und das Protein X aktiv werden kann (Abbildung aus (Thiel & Rössler, 2005)).

INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Retrovirus infiziert, der für Δ B-Raf:ER kodiert. Die Expression des Δ B-Raf/ER-Fusionsproteins, welches unter der Kontrolle des *long terminal repeat* des murinen Stammzellen-Virus stand, wurde mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen die Ligand-Bindedomäne des Östrogenrezeptors (Abbildung 28B) gezeigt. Des Weiteren wurden INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen mit 4OHT für 24 h stimuliert. Abbildung 28C zeigt, dass die Behandlung von INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen mit 4OHT eine etwa 10-fache Verstärkung der Transkription eines ins Chromatin eingebetteten AP-1-responsiven Reportergens induzierte. Ebenso ist zu sehen, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit PD98059 die AP-1-Aktivität reduzierte.

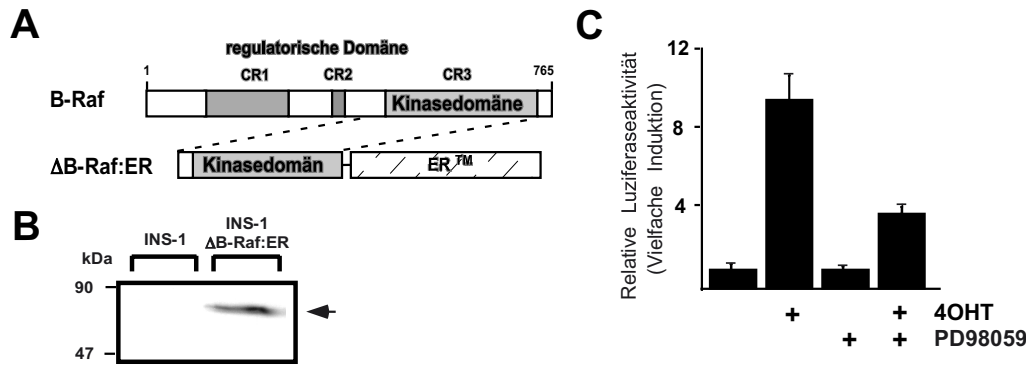


Abbildung 28: Aktivierung des ERK1/2-Signalweges und dessen Bedeutung für die erhöhte AP-1 Aktivität in INS-1-Zellen

A: Generierung von INS-1-Zellen zur Expression einer aktivierbaren Form von B-Raf. Schematische Darstellung der modularen Struktur von B-Raf und Δ B-Raf:ER. Die funktionellen Domänen der Raf-1 (CR3, CR2 und CR1) sind dargestellt. Durch Fusion der katalytischen CR3 Domäne mit der Hormonbinde-Domäne des Östrogenrezeptor wurde Δ B-Raf:ER hergestellt. B: Expression von Δ B-Raf:ER in INS-1-Zellen durch retrovirale Infektion und anschließender Selektion der Gesamtzellextrakte der Δ B-Raf:ER INS-1-Zellen wurden präpariert und durch Western Blot mit einem Antikörper gegen den murinen Östrogenrezeptor analysiert. Zur Kontrolle wurden INS-1-Zellen analysiert. C: INS1- Δ B-Raf:ER Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und in Anwesenheit oder Abwesenheit von PD98059 (50 μ M, 1 h) mit 4OHT (250 nM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferaseaktivität analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.6 Die Bedeutung der p38-Kinase bei der Regulation der AP-1 Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen

In Glukose-behandelten glatten Muskelzellen ist die p38-Protein-Kinase-Aktivität in zeitabhängiger Weise erhöht (Igarashi et al., 1999). Es wurde daher untersucht, ob die p38-Protein-Kinase einen Einfluss auf die Erhöhung der AP-1 Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen ausübt. Abbildung 29A zeigt, dass eine Vorbehandlung der INS-1-Zellen mit dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 die AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten Zellen verringerte. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte eine Vorbehandlung mit SB203580 nicht die AP-1 Aktivität in INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen, welche mit 4OHT stimuliert wurden (Abbildung 29B). Um diese Ergebnisse mit einem alternativen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurde getestet, ob eine induzierte Aktivierung von p38 die AP-1 Aktivität in Abwesenheit einer Glukose-Stimulation in INS-1-Zellen induziert. Dafür wurde eine konstitutiv aktive MKK6-Mutante, MKK6E, in INS-1-Zellen mittels eines lentiviralen Gentransfers exprimiert. Die MKK6E Mutante enthielt zwei Punktmutationen in der Phospho-Akzeptorstelle, Ser207Glu und Thr211Glu, wodurch eine Mutante mit konstitutiv negativen Ladungen an diesen Stellen generiert wurde. Eine Phosphorylierung wird dadurch imitiert (Raingeaud et al., 1996).

Die Mutante MKK6E enthielt zusätzlich ein Flag Epitop am N-Terminus. Die Expression der MKK6E wurde anhand einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Flag Epitop (Abbildung 29C) überprüft. Die funktionale Analyse der MKK6E-Expression ist in Abbildung 29D abgebildet: Die Expression von MKK6E erhöhte die AP-1 Aktivität um das 3,5-fache. Eine Stimulation mit Glukose führte zu einer synergistischen Wirkung, die eine Erhöhung der AP-1 Aktivität um etwa das 22-fache hervorrief. Im Gegensatz dazu wurde in 4OHT-stimulierten INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen, welche MKK6E exprimierten, keine synergistische Wirkung beobachtet (Abbildung 29E). Diese Daten zeigen, dass p38 eine bedeutende Rolle bei der Signalkaskade spielt, welche die Stimulation durch Glukose mit der erhöhten AP-1 Gentranskription in Insulinoma-Zellen verknüpft. Die p38-Proteinkinase ist jedoch nicht erforderlich zur erhöhten AP-1-Transkription infolge einer Δ B-Raf:ER-Aktivierung.

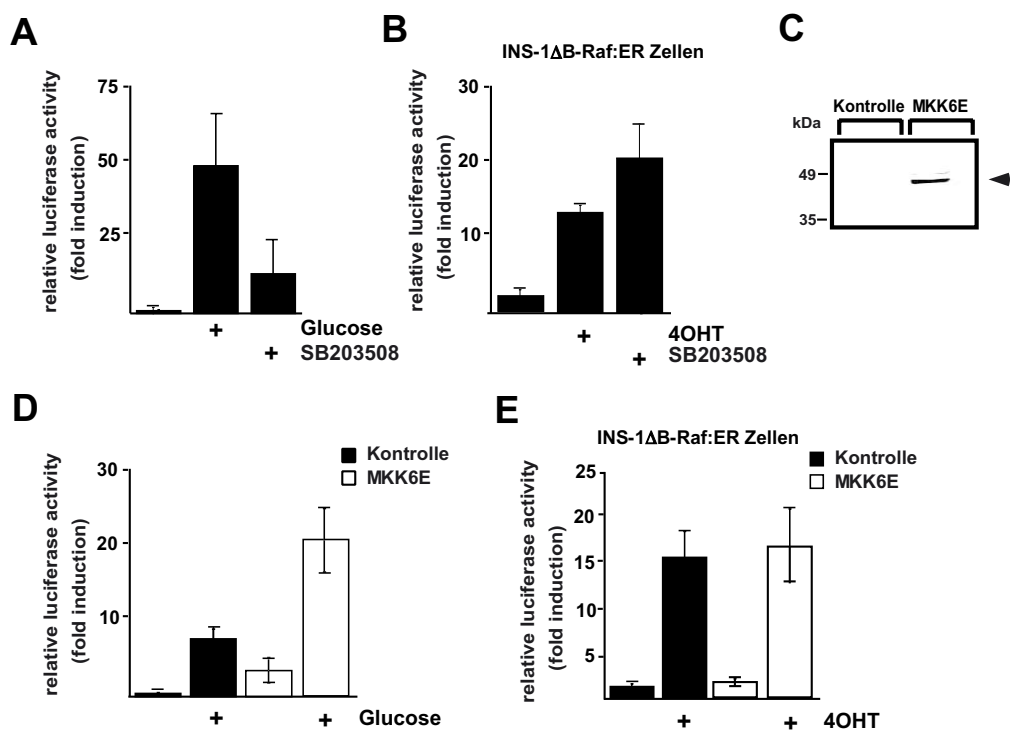


Abbildung 29: AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen wird durch p38 reguliert

A,B: INS-1 Insulinoma-Zellen (A) oder INS-1 Δ B-Raf:ER Zellen (B) wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert, infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von SB203580 (10 mM) kultiviert, wie angegeben. Die Zellen wurden mit Glukose (11 mM) für 48 h (A) oder mit 4OHT (0,25 μ M) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. C: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, die mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert waren, der für die FLAG-markierte MKK6E kodiert. Als Kontrolle wurden INS-1-Zellen präpariert, die mit lentiviralen Vektor pFUW (Kontrolle) enthaltenen Viren infiziert waren. Der Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop detektiert. Molekulare Marker (kDa) sind auf der linken Seite dargestellt. D,E: INS-1 (D) und INS-1 Δ B-Raf:ER-Zellen (E) wurden mit einem Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert und entweder für ein FLAG-markiertes MKK6E oder für die Kontrolle kodiert, doppelt infiziert. Die Zellen wurden mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Stimulation der INS-1 Δ B-Raf:ER Zellen mit 4OHT

(0,25 μ M) erfolgte für 24 h. Zellextrakte wurden hergestellt und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.7 Eine dominante-negative Mutante von SEK1 beeinträchtigt die AP-1 Aktivierung in Glukose-induzierten INS-1-Zellen

SEK1 ist eine MAP-Kinase-Kinase, die von MEKK1 über Phosphorylierung der Serinreste 204 und 207 aktiviert wird. Diese kann die *Jun-NH₂-terminal kinase* (JNK) direkt phosphorylieren und somit aktivieren. Eine Genmutation in der Kodierungssequenz von SEK1 verursacht einen selektiven Defekt der transkriptionellen Aktivität von AP-1 (Yang et al., 1997). Eine Mutation der Phosphorylierungsstellen Serin 204 und 207 zu Alanin oder Leucin generiert die dominante-negative Mutante SEK-AL.

Die Expression von SEK-AL in murinen Fibroblasten zeigte, dass speziell die JNK, aber nicht die p38-Aktivierung beeinträchtigt war (Zanke et al., 1996). Es wurde ein lentiviraler Gentransfervektor generiert, der für FLAG-markiertes SEK-AL kodiert. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass die SEK-AL-Mutante mittels des für FLAG-SEK-AL kodierenden Lentivirus korrekt in INS-1-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 30A). Eine Analyse der AP-1 Aktivität in infizierten Zellen ergab, dass die Expression von SEK-AL eine Erhöhung der AP-1 Aktivität infolge der Glukose-Stimulation (Abbildung 30B) hemmt. Ebenso wurde in 4OHT-stimulierten INS-1- Δ B-Raf:ER-Zellen und in TPA-behandelten HepG2 Zellen die AP-1 Aktivität erheblich reduziert (Abbildung 30C, D). Folglich findet eine Aktivierung von JNK in der Signalkaskade statt, die zur erhöhten AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen führt.

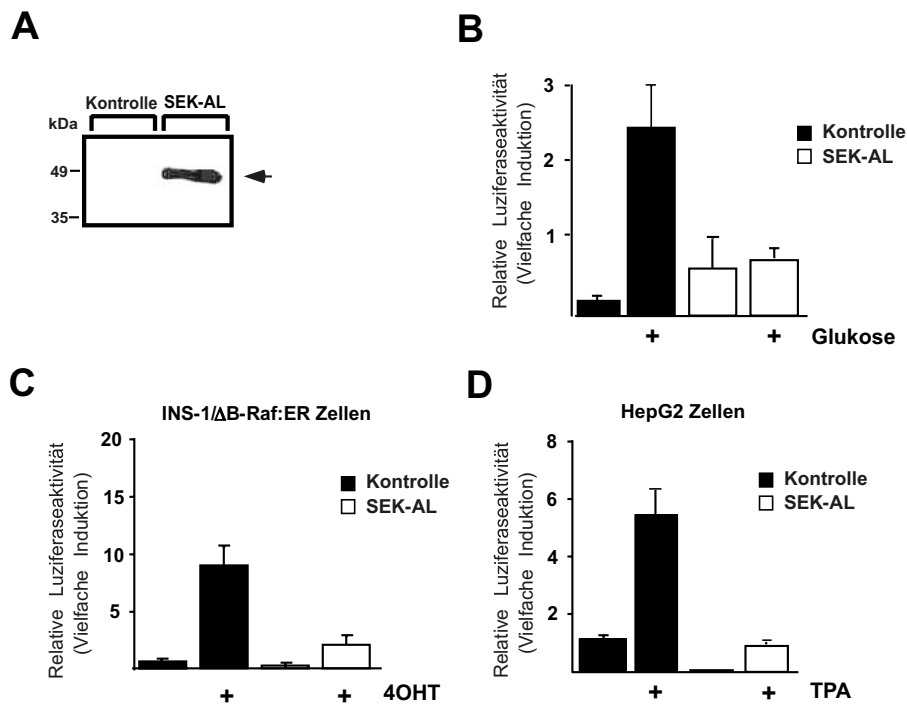


Abbildung 30: Eine dominant-negative Form von SEK1-Proteinkinase beeinträchtigt die Glukose-induzierte Erhöhung der AP-1 Aktivität in INS-1-Zellen

A: Western Blot-Analyse von INS-1-Zellen, welche mit einem Lentivirus, der für ein FLAG-markiertes SEK-AL kodiert, infiziert wurden. Als Kontrolle wurden INS-1-Zellen mit Viren infiziert, die für den lentiviralen Vektor pFUW (Kontrolle) kodieren. Der Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop durchgeführt. Der molekulare Marker ist auf der linken Seite angezeigt. INS-1-Zellen (B), INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen (C), oder HepG2 Zellen (D) wurden mit einem Lentivirus, der für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert und einem Lentivirus, der für ein FLAG-markiertes SEK-AL kodiert, infiziert. Als Kontrolle wurden INS-1-Zellen mit Viren infiziert, die für den lentiviralen Vektor pFUW (Kontrolle) kodieren. INS-1 und INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert (B). Stimulation der infizierten INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen mit 4OHT (0,25 μM) (C) und die Stimulation der infizierten HepG2-Zellen mit TPA (50 ng/ml) (D) erfolgte für 24 h. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert, welche auf die Proteinkonzentration normalisiert wurde.

3.1.1.8 Expression sowie Phosphorylierung von c-Jun sind in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen verstärkt

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Aktivierung der Proteinkinasen ERK1/2, p38 und JNK zu einer vermehrten AP-1-Aktivität in INS-1-Zellen führen, die zuvor mit Glukose stimuliert wurden. Interessanterweise ist die Aktivierung dieser Kinasen mit einer Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun verknüpft. Dies deutet darauf hin, dass c-Jun möglicherweise als Konvergenzpunkt für intrazelluläre Signalkaskaden agiert, welche die MAP-Kinasekaskade involviert. Abbildung 31A (oberes Bild) zeigt eine gesteigerte Expression und Phosphorylierung von c-Jun in Glukose-behandelten INS-1-Zellen. Ebenso war in 4OHT-stimulierten INS-1/ΔB-Raf:ER-Zellen und in TPA-behandelten HepG2 Zellen die c-Jun Expression und Phosphorylierung erhöht (Abbildung 31A, mittleres und unteres Bild).

3.1.1.8.1 c-Jun reguliert die AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen

Um einzuschätzen, welche Rolle c-Jun bei der Regulierung der AP-1 Aktivität in INS-1 Insulinoma-Zellen spielt, wurde ein dominant-negativer Ansatz gewählt. Der modulare Aufbau von c-Jun sowie eine dominante-negative Mutante von c-Jun, c-Jun Δ N, sind in Abbildung 31B dargestellt. c-Jun Δ N umfasst die Aminosäurereste 188 bis 321 von c-Jun. Die dominante-negative Mutante enthält die basische Leucin-Zipper Domäne (bZIP), welche für die Dimerisierung und DNA-Bindung verantwortlich ist, aber ihr fehlen die N-terminale regulatorische Region und die transkriptionelle Aktivierungsdomäne am NH₂-Terminus. Die dominante-negative Mutante ist unfähig, die Transkription zu aktivieren, weil ihr die transkriptionelle Aktivierungsdomäne fehlt, jedoch ist sie dimerisierungsfähig. Vielmehr hemmt die Mutante die DNA-Bindfähigkeit des entsprechenden bZIP-Wildtyps: Sie blockiert die Erkennungssequenzen zur DNA-Bindung und verdrängt somit den Wildtyp.

Die Western Blot-Analyse mittels eines Antikörpers gegen das Flag Eпитop ist in Abbildung 31C zu sehen. Die Expression von c-Jun Δ N blockiert die Erhöhung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen (D). Dies weist darauf hin, dass c-Jun an der erhöhten AP-1-vermittelten Gentranskription in INS-1-Zellen beteiligt ist, welche zuvor mit Glukose stimuliert wurden. Ebenso wurde die AP-1 Aktivität in 4OHT-stimulierten INS-1 Δ B - Raf:ER Zellen (Abbildung 31E) und in TPA-behandelten HepG2 Zellen (Abbildung 31F), welche die Mutante c-Jun Δ N exprimieren, erheblich reduziert. Daraus lässt sich folgern, dass c-Jun ein Partner im AP-1-Komplex bei der Glukose-induzierten Signalkaskade zu sein scheint und somit an der erhöhten AP-1 vermittelten Gentranskription nach Stimulation mit Glukose beteiligt ist.

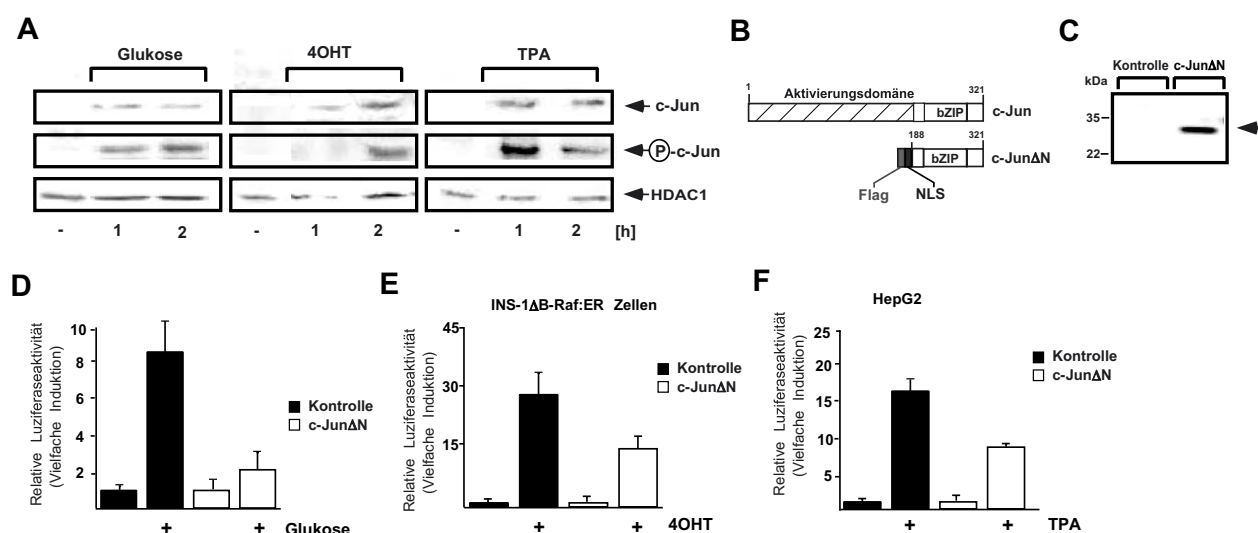


Abbildung 31: c-Jun ist für die Glukose-induzierte Verstärkung der AP-1 Transkription notwendig

A: INS-1-Zellen, INS-1 Δ B-Raf:ER Zellen und HepG2 Hepatoma Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) und mit Glukose (11 mM), mit 4OHT (250 nM) oder mit TPA (50 ng/ml) für die

Zeiträume (1 h, 2 h) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen c-Jun, phosphorylierten c-Jun, oder HDAC1, inkubiert. Jeder hier gezeigte Versuch wurde mindestens drei Mal mit konstanten Ergebnissen wiederholt. B: Modularer Aufbau von c-Jun und der dominante-negative Mutante c-Jun Δ N. Die dominante-negative Mutante enthält die basische Leucin-Zipper Domäne (bZIP), welche für die Dimerisierung und DNA-Bindung verantwortlich ist, aber ihr fehlt die transkriptionelle Aktivierungsdomäne am NH₂-Terminus. C: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche zuvor mit einem c-Jun Δ N kodierenden Lentivirus infiziert wurden. Als Kontrolle wurden Kontrollvektor-infizierte Zellen analysiert. Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop durchgeführt. D, E, F: INS-1-Zellen (D) bzw. INS-1 Δ B-Raf:ER Zellen (E) bzw. HepG2 Zellen (F) wurden mit Lentiviren doppelt infiziert, die für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen und für das FLAG markiert c-Jun Δ N kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM Glukose). Die anschließende Stimulation mit Glukose (11 mM) (D) erfolgte für 48 h, mit 4OHT (250 nM) (E) oder mit TPA (50 ng/ml) (F) für 24 h. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten ermittelt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.1.8.2 c-Jun ist ein AP-1-reguliertes Zielgen in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen

Aus den vorangehenden Ergebnissen ging deutlich hervor, dass c-Jun durch Glukose-Stimulation in INS-1-Zellen verstärkt exprimiert wird. Gleichzeitig wird c-Jun phosphoryliert und aktiviert. Diese Aktivierung wird durch verschiedene MAP Kinasen induziert. Durch andere Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass c-Jun an die AP-1 Bindestelle in der c-Jun Promotorregion bindet (Angel et al., 1988). Somit stellte sich die Frage, ob c-Jun ein potentiell AP-1 Zielgen bei der Glukose-induzierten Signalkaskade ist. Um dies zu analysieren, wurde die dominant-negative Mutante von c-Jun herangezogen. Abbildung 32 zeigt, dass die Expression von c-Jun in Glukose-behandelten INS-1-Zellen, welche die dominant-negative Mutante c-Jun Δ N exprimieren, reduziert wurde. Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist demnach ein AP-1-reguliertes Zielgen.

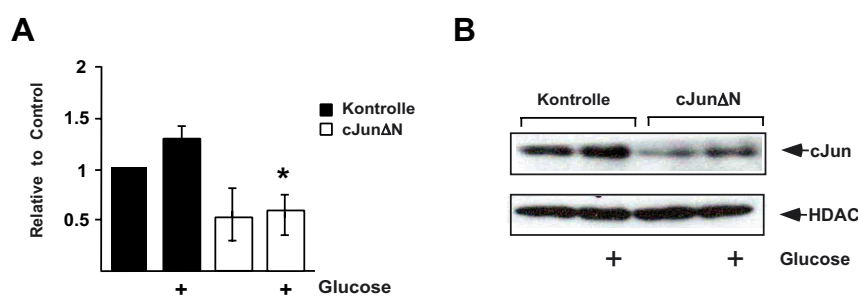


Abbildung 32: c-Jun ist ein AP-1 reguliertes Zielgen

A,B: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das FLAG markierte c-Jun Δ N kodieren. Als Kontrolle wurden Kontroll-infizierte INS-1-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) und mit Glukose (11 mM) für 2 h stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen c-Jun, oder HDAC1 inkubiert. Die Blots wurden quantifiziert und in einem Balkendiagramm dargestellt. P=0,007

3.1.1.9 Aktivierung von ternären Komplexfaktoren ist für die Erhöhung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen erforderlich

Die Glukose-Stimulation von MIN6-Zellen unter Einbeziehung des ERK-Signalweges führt zur Expression und zur Phosphorylierung von c-Fos (Glauser & Schlegel, 2007). ERK1/2 transloziert in den Kern, phosphoryliert und aktiviert dort ternäre Komplexfaktoren, die wiederum die c-Fos Gentranskription stimulieren. Des Weiteren wurde berichtet, dass Phosphorylierung und Aktivierung von Elk-1 mittels Serum-Stimulation über die MAPK-Kaskade vermittelt wird (Yang et al., 1998). JNK und p38 können Elk-1 phosphorylieren (Raingeaud et al., 1996). Dadurch wurde es interessant zu untersuchen, ob ERK1/2 nicht nur über die Aktivierung von c-Jun, sondern auch über die Aktivierung von Elk-1 an der AP-1 regulierten Kaskade beteiligt ist.

Elk-1 gehört zur ternären Komplex-Faktor (TCF)-Familie, deren C-terminale Transaktivierungsdomäne unter allen Mitgliedern konserviert ist. Die Phosphorylierung an dem S/TP Motiv führt zur Transaktivierung, wobei die ETS-Domäne die DNA-Bindung vermittelt. Zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren, z. B. dem *serum response factor* (SRF) lagert sich Elk-1 nach Aktivierung an das *serum response element* (SRE) in der Promotorregion eines Gens an, z. B. des c-Fos-Gens, und steuert die Genexpression. Nun war es von Interesse, die Auswirkungen der ternären Komplexfaktor-Aktivierung in Bezug auf die Regulierung der AP-1 Aktivität in INS-1-Zellen zu untersuchen. Dafür wurde eine dominant-negative Mutante von Elk-1, REST/Elk-1 Δ C (Abbildung 33A), verwendet. Diese Mutante besitzt die DNA-Binde- und SRF-Interaktionsdomäne, jedoch fehlt die C-terminale Aktivierungsdomäne von Elk-1. REST/Elk-1 Δ C enthält zusätzlich ein Flag Epitop zum immunologischen Nachweis, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie die N-terminale Repressionsdomäne des Transkriptionshemmers REST (Thiel et al., 1998). Diese führt zu einer geschlossenen Chromatinstruktur und erschwert folglich die Transkription. Die Kernproteine Kontroll-infizierter INS-1-Zellen oder INS-1-Zellen, welche mit einem REST/Elk-1 Δ C kodierendem Lentivirus infiziert waren, wurden mittels SDS-PAGE fraktioniert und das Fusionsprotein anschließend durch eine Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Flag Epitop (Abbildung 33 B) detektiert. Das Protein wurde wie erwartet exprimiert. Um die Funktionalität der REST/Elk-1 Δ C Mutante zu demonstrieren, wurde dieses Fusionsprotein zusammen mit dem SREluc-Reporter in INS-1-Zellen exprimiert, der die proximalen SRE #1 und #2 des Egr-1 Promotors stromaufwärts eines Minimalpromotors enthielt (Rössler & Thiel, 2009). Eine schematische Darstellung des integrierten Provirus, welcher für das SRE-regulierte Luziferase/Reportergen kodiert, ist in Abbildung 33C dargestellt. Abbildung 33 (oberes Bild) zeigt, dass eine Stimulation von INS-1-Zellen mit Glukose eine deutliche Erhöhung der SRE regulierten Transkription induziert,

welche von REST/EIk-1 Δ C blockiert werden kann. Ebenso war die SRE-vermittelte Transkription in 4OHT-stimulierten INS-1 Δ B-Raf:ER-Zellen und in TPA-behandelten HepG2-Zellen verstärkt (Abbildung 33D, mittleres und unteres Bild). Die Expression der REST/EIk-1 Δ C-Mutante reduzierte die Transkription des SRE-gesteuerten Reportergens. Dies illustriert, dass das Fusionsprotein eine dominant-negative Funktion in diesem Kontext ausübt. Im Weiteren wurde die biologische Rolle der ternären Komplex Faktoren auf die AP-1-Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen untersucht. In Abbildung 33E (oberes Bild) ist dargestellt, wie die Expression der REST/EIk-1 Δ C die erhöhte AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen blockiert. Ebenso lag eine erheblich erniedrigte AP-1 Aktivität in 4OHT-stimulierten INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen (Abbildung 33E, mittleres Bild) und in TPA-behandelten HepG2-Zellen vor (Abbildung 33E, unteres Bild).

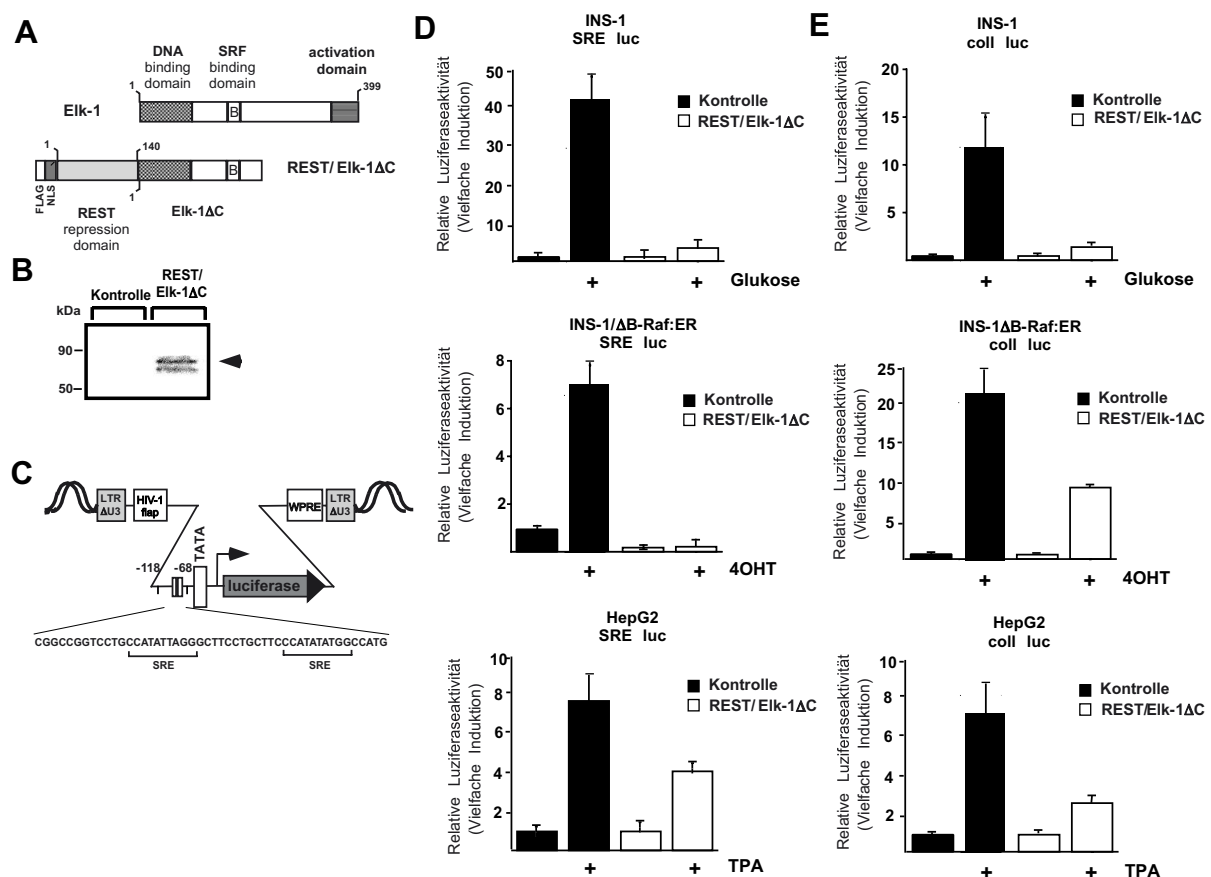


Abbildung 33: Hemmung der ternären Komplexfaktor-Aktivität verhindert die Glukose-induzierte Erhöhung der AP-1-Aktivität

A: Modulare Struktur von Elk-1 und der dominant-negativen Mutante REST/EIk-1 Δ C. Die DNA-bindende Domäne befindet sich am N-Terminus und die transkriptionelle Aktivierungsdomäne am C-Terminus. Eine regulatorische Domäne liegt innerhalb dieser Aktivierungsdomäne und umfasst die wichtigsten Phospho-Akzeptorstellen S383 und S389. Elk-1 bindet mit einer B-Domäne an SRF, so dass die Bildung des ternären Elk-1-SRF-Komplexes entsteht. Die B-Domäne verbindet auch die C-terminale Phosphorylierung von Elk-1 mit einer verstärkten DNA-Bindung über die ETS-Domäne. Der dominant-negativen Mutante REST/EIk-1 Δ C fehlt die durch Phosphorylierung regulierte Aktivierungsdomäne, aber enthält die DNA- und SRF-Binde-Domänen. Das verkürzte Elk-1 ist als ein

Fusionsprotein mit der transkriptionellen Repressionsdomäne von REST exprimiert. B: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, die mit einem rekombinanten Lentivirus, der für REST/Elk-1 Δ C kodiert, infiziert waren. Der Western Blot wurde mit einem Antikörper gegen das Flag-Tag durchgeführt. C: Schematische Darstellung eines integrierten Provirus, der für ein SRE-gesteuertes Reporter-gen kodiert. Die Transkriptionseinheit enthält die beiden proximale SRE # 1 und # 2 des Egr-1 Promotors stromaufwärts eines Minimal-Promotors. D, E: INS-1-Zellen (oben), INS-1/ Δ B-Raf:ER Zellen (mittlere Bild) und HepG2 Hepatoma Zellen (unten) wurden mit Lentiviren, welche für das SRE-gesteuerte Luziferase-Reporter-gen (D) bzw. das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter-gen (E) kodiert sowie für FLAG-markiertes REST/Elk-1 Δ C, doppelt infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die zuvor mit dem Vektor pFUW (Kontrolle) infiziert wurden. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) anschließend entweder mit Glukose (11 mM, oben) für 48 h oder 4OHT (250 nM, mitte) oder TPA (50 ng/ml, unten) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert, welche auf die Proteinkonzentration normalisiert wurden.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass eine Aktivierung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen und eine erhöhte zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration für die Hochregulierung der AP-1 Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen von essentieller Bedeutung sind. Darüber hinaus zeigen die Resultate, dass eine kombinatorische Aktivierung der Proteinkinase Raf, der extrazellulären Signal-regulierten Proteinkinase (ERK), p38, und c-Jun NH₂-terminale Proteinkinase (JNK) zur verstärkten AP-1-Aktivität beitragen. Es konnten zusätzlich Beweise präsentiert werden, dass c-Jun und ternäre Komplexfaktoren an der Regulierung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen beteiligt sind. Desweiteren wurde aufgezeigt, dass c-Jun als mögliches Zielgen in der Glukose-induzierten AP-1 Signalkaskade fungiert.

3.1.2 Rolle der Ca²⁺-Mikrodomänen bei der Glukose-regulierten Gentranskription von bZIP-Transkriptionsfaktoren in Insulinoma-Zellen

3.1.2.1 Phosphorylierung und Expression von c-Jun und CREB in Glukose-stimulierten INS-1 Insulinoma-Zellen

Wie unter 3.1.1.2 gezeigt, wird die AP-1 Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen enorm verstärkt. Nach dem aktuellen Forschungsstand setzt sich der AP-1 Transkriptionsfaktor aus einer Gruppe verschiedener Homo- und Heterodimere aus den Mitgliedern der Jun/Fos-Familie zusammen. Die Aktivierung von c-Fos durch Glukose wurde bereits beschrieben (Glauser & Schlegel, 2007). Die Beteiligung des bZIPs c-Jun bei der Glukose-induzierten AP-1-Aktivierung ist unter 3.1.1.8 gezeigt. Die Expression von c-Jun und c-Fos in INS-1 wurde analysiert: Die Zellen wurden dafür mit Glukose für verschiedene Zeitpunkte inkubiert, geerntet und Kernextrakte hergestellt. Diese wurden im Western Blot auf die c-Jun bzw. c-Fos Expression durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers untersucht. In Abbildung 34 ist zu sehen, dass die Glukose-Stimulation die c-Fos und c-Jun Biosynthese zeitabhängig induziert. c-Jun als Substrat der c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) ist in phosphorylierter Form zur Erhöhung der Transkriptionsaktivität von c-Jun

notwendig. In Abbildung 34 ist zu sehen, dass c-Jun durch Stimulation mit Glukose phosphoryliert wird, was auch eine Aktivierung von c-Jun als Ergebnis der Glukose-Stimulation anzeigt. Die Aktivierung des bZIP-Proteins CREB in Insulinoma-Zellen wurde bereits beschrieben (Wang et al., 2008), (Mayer & Thiel, 2009). Abbildung 34 bestätigt, dass durch Glukose eine Phosphorylierung von CREB induziert wird, während die CREB-Expression dagegen konstant bleibt. Zur Kontrolle konnte unter Verwendung des Zinkfinger Egr-1 gezeigt werden, dass Egr-1 in Glukose-behandelten Insulinoma-Zellen verstärkt exprimiert wird (Frödin et al., 1995), (Josefsen et al., 1999), (Bernal-Mizrachi et al., 2000).

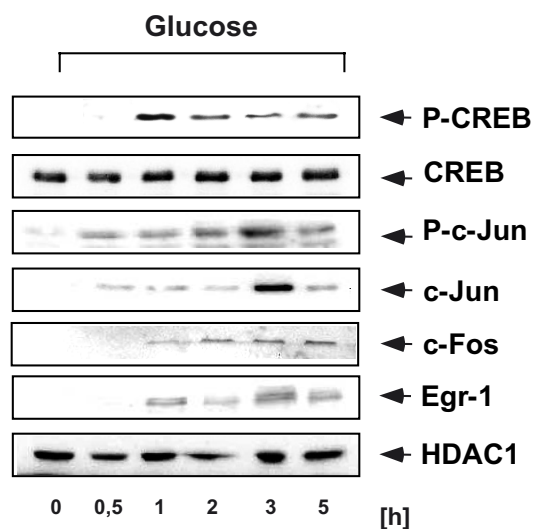


Abbildung 34: Glukose reguliert die Phosphorylierung von c-Jun sowie CREB und die Expression von c-Jun, c-Fos und Egr-1

INS-1-Zellen wurden für 24 h in Serum-freiem Medium und Glukose-reduziert (2mM) und mit Glukose (11mM) stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen CREB, c-Jun, c-Fos, die phosphorylierte Form von CREB und c-Fos sowie gegen Egr-1 eingesetzt. Der HDAC1-Antikörper diente zur Ladungskontrolle.

3.1.2.2 Erhöhte c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität in Glukose-behandelten Insulinoma-Zellen

Glukose stimuliert die Expression von c-Jun und c-Fos. Dies sollte durch lentiviralen Gentransfer eines ins Chromatin eingebetteten c-Jun bzw. c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergens, das gegenüber transient in die Zelle eingebrachten Reportergenen den bedeutenden Vorteil besitzt, den gleichen Regulationsmechanismen wie zelleigene Gene unterworfen zu sein, bestätigt werden. Auf diese Weise erhobene Daten liefern zellgetreuere Aussagen, jedoch fällt die Stimulation durch in der Zelle vorliegende repressive Regulationen im Vergleich zu Reportergenen, die als extrachromosomale Struktur im Kern vorliegen, häufig geringer aus. Eine schematische Darstellung der integrierten Proviren, welche für ein c-Jun bzw. c-Fos-Promotor/Luziferasegen kodieren, ist in Abbildung 35 dargestellt. Zusätzlich ist die Deletion der TRE-Sequenzen im c-Jun-Promotor eingezeichnet (Abbildung

35A). Diese Mutation diente der Bestimmung der Rolle der TRE-Sequenzen im c-Jun-Promotor bei der Glukose-vermittelten c-Jun-Promotoraktivierung. Durch Stimulation mit Glukose konnte der c-Jun-Promotor sowie der c-Fos-Promotor in INS-1-Zellen deutlich aktiviert werden, was sich in der verstärkten Reporterogenaktivität in Abbildung 35 zeigte. Bei Mutation der TRE-Sequenz im c-Jun-Promotor konnte diese Glukose-induzierte Stimulierung nicht gemessen werden.

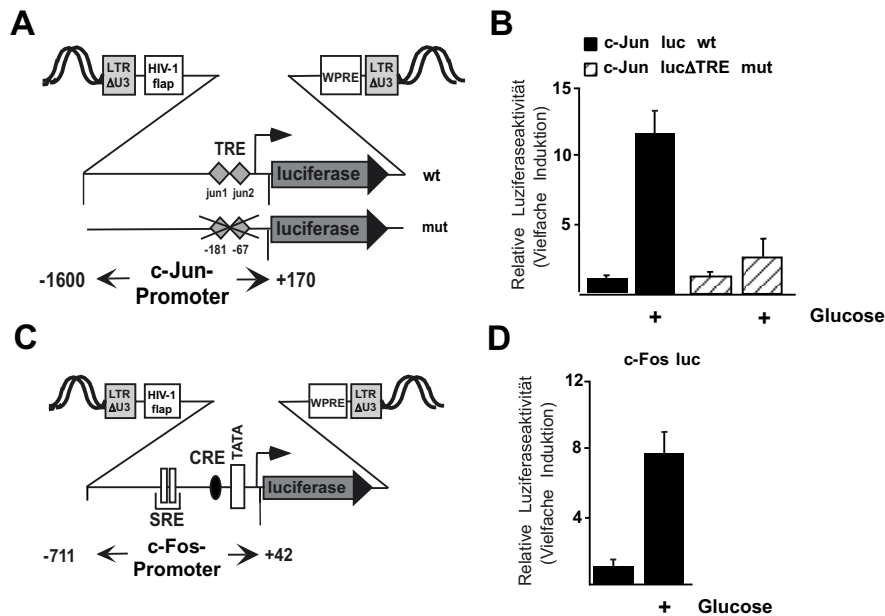


Abbildung 35: c-Jun und c-Fos-Promotor-Aktivierung in Glukose-behandelten INS-1-Zellen

A, C: Schematische Darstellung der integrierten Proviren, welche für ein c-Jun(A) bzw. c-Fos(C)-Promotor/Luziferasegen kodieren. Die U3 Region des 5'LTR des Transfervektors ist deletiert, das *woodchuck hepatitis virus posttranslational regulatory element* (WPRE) und das *HIV-flap element* sind eingezeichnet. Die Lage der zwei TRE-ähnlichen Elemente ist angezeigt. Diese wurden im c-Jun Δ TRE-Promotor/Luziferase-Reportergen mutiert. Die Lage des CRE und der beiden SRE im c-Fos-Promotor ist indiziert. B, D: INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der für ein c-Jun bzw. mutiertes c-Jun(B) oder c-Fos(D)-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert, infiziert. Die Zellen wurden für 48 h mit Glukose stimuliert, Kernextrakte präpariert und die Luziferaseaktivität ermittelt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.3 Erhöhte zyklische *AMP response element* (CRE)-vermittelte Transkription in Glukose-behandelten INS-1-Zellen

Die Phosphorylierung von CREB, welche durch Glukose induziert wird, stellt keinen sicheren Nachweis der CREB-Zielgenaktivierung dar (Zhang et al., 2005). Aufgrund der Stimulierung des c-Fos-Promotors und zur Messung der tatsächlichen CREB-vermittelten Gentranskription wurde ein modellhaftes Reportergen mittels eines lentiviralen Gentransfers in die INS-1-Zellen integriert, das 4 Kopien der CRE-Sequenz aus dem c-Fos-Promotor oberhalb eines Minimal-Promotors besaß (Abbildung 36A) und dadurch einzig durch die CRE-Elemente kontrolliert wurde. In Abbildung 36B ist gezeigt, dass die Transkription eines CRE-regulierten Reportergens deutlich durch Glukose in INS-1-Zellen stimuliert wurde. Dies

verweist darauf, dass Glukose durch Aktivierung von CREB-regulierten Genen das genetische Programm der INS-1-Zellen beeinflusst.

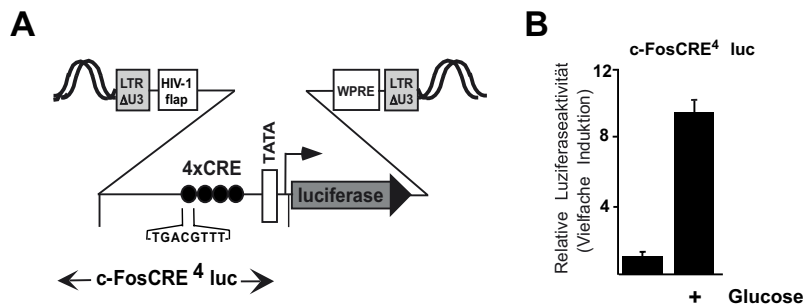


Abbildung 36: Erhöhte CRE-vermittelte Gentranskription in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen

A: Schematische Darstellung der integrierten Proviren, welche für ein CRE-reguliertes Promotor/Luziferasegen kodieren. Die regulatorische Region enthält einen Minimal-Promotor der menschlichen *immunodeficiency virus* TATA Box, das *adenovirus major late* Promotor initiator element und 4 Kopien der CRE-Sequenz, welche vom c-Fos-Promotor stammen. B: Infizierte INS-1-Zellen wurden nach 24 h Glukosereduktion für 48 h mit Glukose inkubiert. Zellextrakte wurden daraus hergestellt, die Luziferaseaktivität bestimmt und auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.4 Erhöhte Egr-1-Promotoraktivität in Glukose-behandelten Insulinoma-Zellen

Die Analyse des Glukose-stimulierten Reportergens, das unter der Kontrolle des Egr-1-Promotors steht, diente der Kontrolle. Die Aktivierung des Egr-1-Promotors in INS-1 durch Glukose ist in Abbildung 37A, unten, gezeigt. Der Egr-1-Promotor verfügt u. a. über mehrere SREs, wie in Abbildung 37A, oben, abgebildet ist. Zur Bestimmung der Rolle der regulatorischen Elemente im Egr-1-Promotor in Glukose-behandelten INS-1-Zellen wurde eine dominant-negative Mutante von Elk-1 eingesetzt. In Abbildung 37B, oben, zu sehen, ist die Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1, REST/Elk-1 Δ C, welche zur Untersuchung des SRE diente. Diese wurde bereits unter 3.1.1.9 beschrieben. Durch das Fehlen der C-terminalen Aktivierungsdomäne von Elk-1 und dem Besitz der DNA-Bindedomäne sowie SRF-Interaktionsdomäne kann die Mutante ihren dominant-negativen Charakter ausüben und die SRE-vermittelte Transkription hemmen. Das Fusionsprotein konnte mittels Western Blot-Analyse mit spezifischem Flag-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 37C). Bei Expression dieser Mutante in INS-1-Zellen und anschließender Stimulierung mit Glukose war, wie in Abbildung 37D, E zu sehen ist, eine verminderte Egr-1-Promotor/Reportergentranskription zu beobachten. Das weist darauf hin, dass das SRE für die Glukose-Sensitivität des Egr-1 Gens verantwortlich ist.

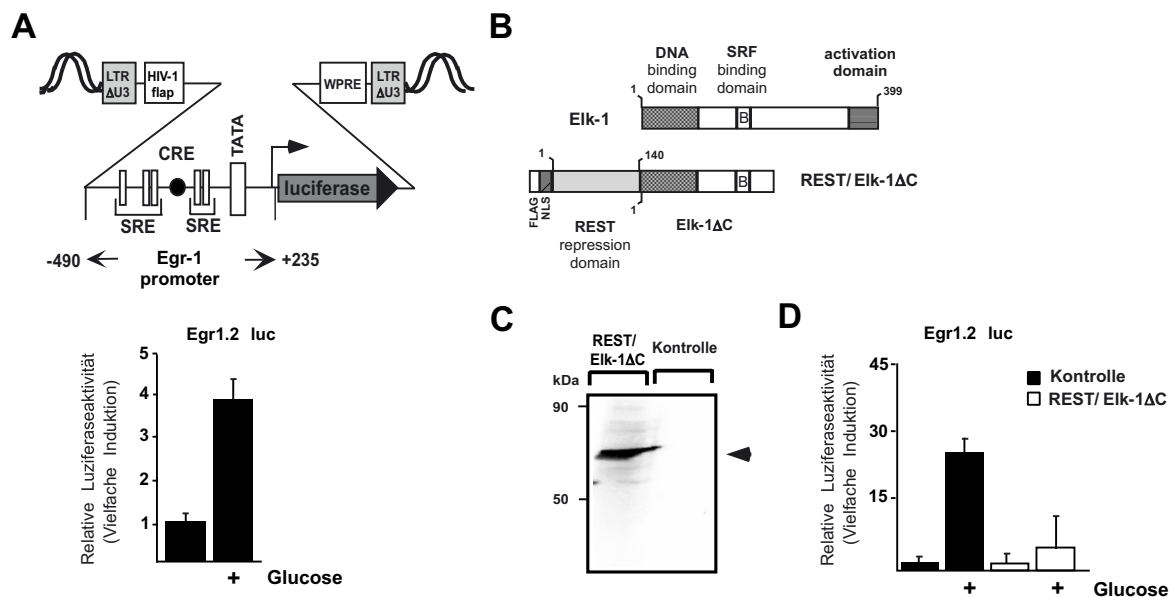


Abbildung 37: Glukose erhöht die Egr-1-Promotoraktivität mittels der SREs in Insulinoma-Zellen

A: Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für das Egr-1-Promotor/Luziferasegen kodiert. Die Lage der CRE und SRE-Elemente ist eingezeichnet. Solch infizierte INS-1-Zellen wurden für 48 h mit Glukose stimuliert und die Luziferaseaktivität des hergestellten Kernextrakts bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. B: Schematische Darstellung von Elk-1 sowie dessen dominant-negativen Mutante REST/EIk-1ΔC. Die DNA-Bindedomäne von Elk-1 befindet sich am N-Terminus, die transkriptionelle Aktivierungsdomäne am C-Terminus. Eine regulatorische Domäne liegt innerhalb der Aktivierungsdomäne mit den Haupt-Phosphoakzeptorstellen S383 und S389. Die Mutanten wurden als Fusionsproteine mit der transkriptionellen Repressionsdomäne REST, einem Flag-Tag zum Nachweis der Expression und einem Kernlokalisierungssignal hergestellt. C: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche entweder mit Mock oder mit einem rekombinanten Lentivirus-kodierend für REST/EIk-1ΔC infiziert wurden. Mittels des FLAG-spezifischen Antikörpers wurde im Western Blot die Mutante detektiert. D: INS-1-Zellen wurden mit einem Lentivirus, der für das Egr-1-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert, sowie mit einem Lentivirus, der für REST/EIk-1ΔC kodiert oder als Kontrolle den Leervektor pFUW enthält, doppelt infiziert. Die infizierten Zellen wurden für 48 h mit Glukose stimuliert, Zellextrakte präpariert und die Luziferaseaktivität ermittelt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.5 Rolle der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen bei der Transkriptionsaktivität nach Stimulation mit Glukose

Beim Glukose-Signalweg in INS-1-Zellen kommt es zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. Die Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in Folge der Glukose-Stimulation ist ein notwendiger Schritt zur Signalweiterleitung hin zur verstärkten AP-1 Aktivität in Insulinoma-Zellen, wie unter 3.1.1.2 beschrieben ist.

In diesem Kontext der Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle wurde die c-Jun, die Egr-1 und die c-Fos-Promotoraktivität untersucht. Eine Inkubation der Zellen mit Verapamil hemmte vollständig die jeweilige Glukose-induzierte Reporter gen-Transkription in INS-1-Zellen (Abbildung 38A-C). Vergleichbar zur erhöhten CRE-vermittelten Transkription ist ebenso die

Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ein wichtiges Ereignis des Glukose-Signalweges (Abbildung 38D).

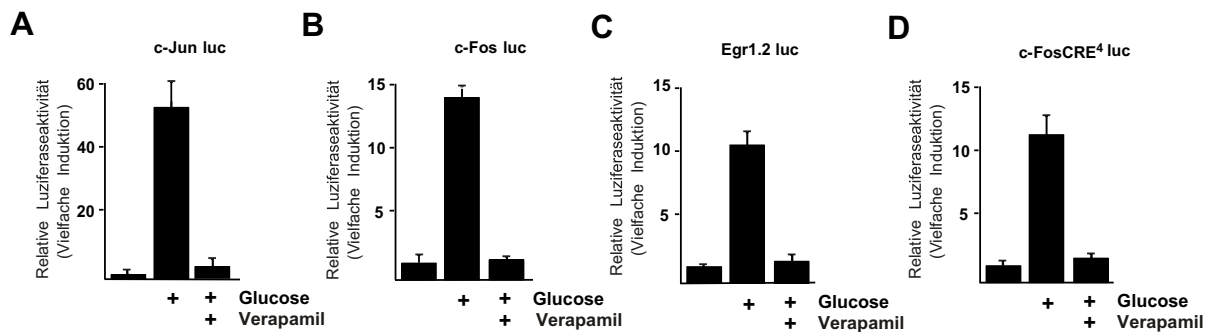


Abbildung 38: Glukose-regulierte Gentranskription in INS-1-Zellen bedarf der Aktivierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen

INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für das c-Jun-Promotor(A)-, c-Fos-Promotor(B)-, Egr-1-Promotor (C)- oder ein CRE-reguliertes Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert (Abbildung 22A). Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert, mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert und zusätzlich in An- oder Abwesenheit von Verapamil analysiert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration normiert wurde.

3.1.2.6 Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen

Glukose induzierte einen Ca^{2+} -Einstrom in die β -Zellen durch die Öffnung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (3.1.2.5). Die vorangehenden Daten zeigen, dass spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle zur Glukose-erhöhten Aktivierung der Reportergene notwendig sind, welche durch den Kollagenase-Promotor, den c-Jun-Promotor, den c-Fos-Promotor, den Egr-1-Promotor oder mehrfache CRE-Elemente in INS-1 reguliert werden. Ein *knockdown*-Experiment bezüglich der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle wurde angeschlossen, um die bedeutende Rolle der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in INS-1-Zellen bei der Glukose-vermittelten Genregulation zu bekräftigen. Deshalb wurden die Zellen mit Glukose stimuliert und die Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal Expression durch Expression einer $\text{Ca}_v1.2$ spezifischen shRNA geblockt. Dazu wurde eine $\text{Ca}_v1.2$ shRNA in den Zellen exprimiert und mit Glukose stimuliert. Die Expression dieses L-Typ-Subtypes – in Abbildung 39 gezeigt und bei späteren Experimenten diskutiert – wurde durch andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt (Li & Zhang, 2009). Die Expression der lentiviral-integrierten $\text{Ca}_v1.2$ -spezifischen shRNA ist in Abbildung 39A gezeigt. Die funktionale Untersuchung ergab, dass der *knockdown* der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle mittels shRNA-Expression die AP-1 vermittelte sowie c-Fos, c-Jun, Egr-1 und CRE-vermittelte Genexpression in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen deutlich inhibierte (Abbildung 39B-F). Diese Ergebnisse konnten die besondere Bedeutung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen und der damit einhergehenden AP-1-regulierten, c-Fos-, c-Jun-, Egr-1- sowie CRE-vermittelten Gentranskription bestätigen.

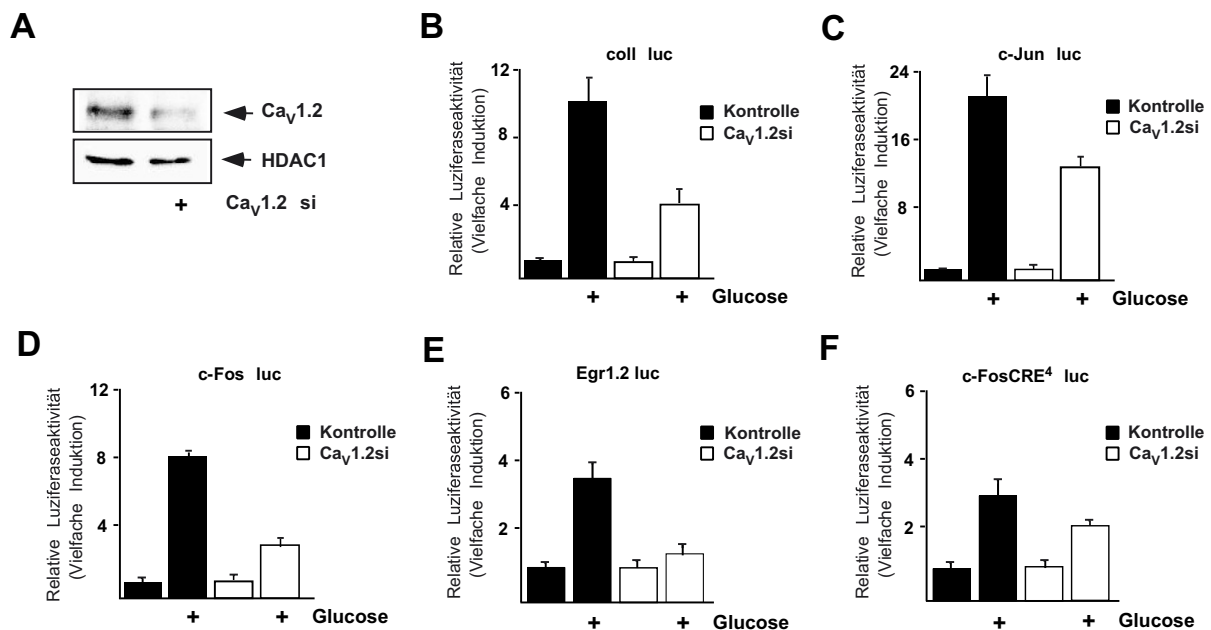


Abbildung 39: Hemmung der Expression der spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle blockiert die Pregnenolonsulfat-induzierte c-Jun und c-Fos Expression sowie die AP-1-regulierte Transkription in INS-1-Zellen

A: Nachweis der Ca_V1.2 shRNA-Expression nach erfolgreicher lentiviraler Infektion der INS-1-Zellen: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche entweder mit Mock oder mit einem rekombinanten Lentivirus, der für die spezifische shRNA gegen Ca_V1.2 kodiert, infiziert wurden. Mit Hilfe eines Ca_V1.2-spezifischen Antikörpers wurde im Western Blot die erniedrigte, endogene Ca_V1.2 -Expression nach *knockdown* detektiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper. B: INS-1-Zellen wurden für 24 h kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Luciferasegen unter Kontrolle des Kollagenase-Promotors (B), des c-Jun-Promotors (C), des c-Fos-Promotors (D), des Egr1-Promotors (E) oder des künstlichen CRE-Promotors kodieren. Zusätzlich wurden die INS-1-Zellen mit einem Lentivirus, der entweder für die Kontrolle oder für die Ca_V1.2-spezifische shRNA kodiert, doppelt infiziert. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert und anschließend mit Glukose für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert die Luciferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.7 Erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen sind bei der Glukose-stimulierten Gentranskription beteiligt

Die Bedeutung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen bei der Signalkaskade in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen wurde unter Verwendung des Acetoxy-Methylesters des zytosolischen Ca²⁺-Chelators BAPTA (BAPTA-AM) analysiert. Durch Inhibierung der erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen mittels des Ca²⁺-Chelators BAPTA-AM konnte die Glukose-induzierte Transkriptionsaktivität des Reportergens unter Kontrolle des Kollagenase-Promotors, des c-Jun-, des c-Fos-, des Egr-1- sowie des CRE-regulierten Promotors verhindert werden (Abbildung 40). Folglich ist eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in der Glukose-vermittelten Transkription in INS-1-Zellen notwendig.

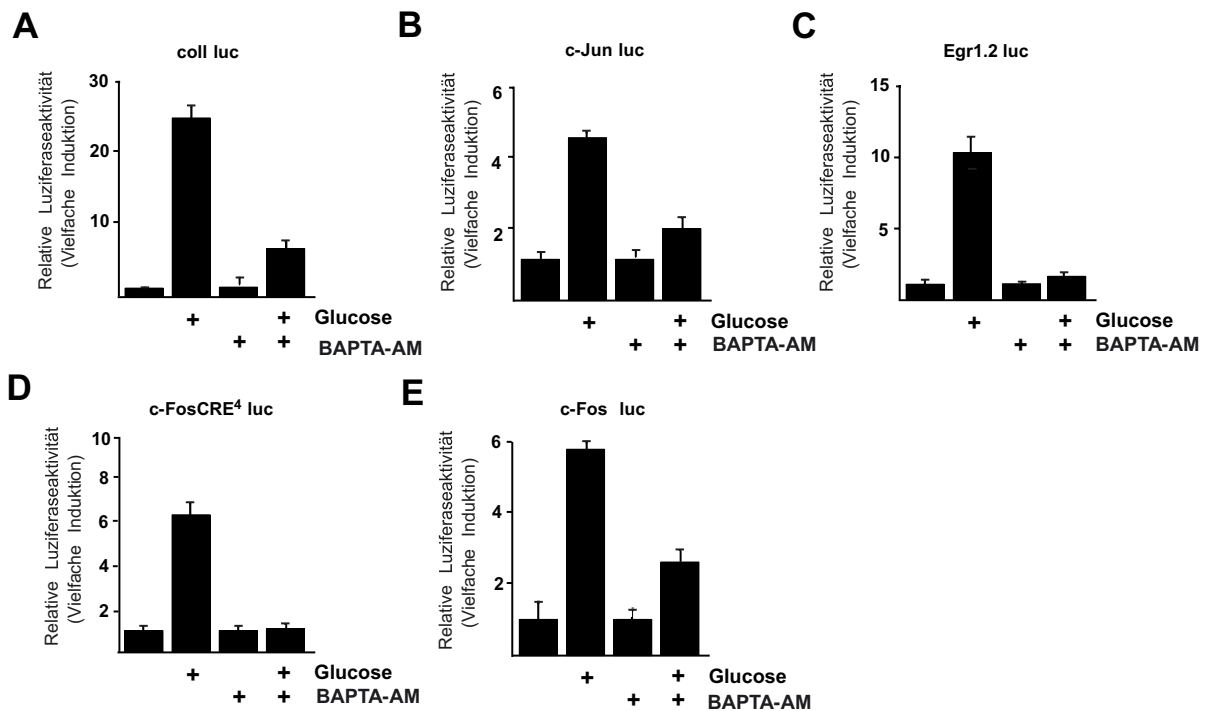


Abbildung 40: Eine verstärkte Gentranskription in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen ist von intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration abhängig

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der für ein Kollagenase (A), ein c-Jun-Promotor (B)/-, c-Fos-Promotor (E)/-, Egr-1-Promotor (C)/- oder ein CRE-reguliertes Promotor/Luziferase-Reportergen (D) kodiert, infiziert. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert, anschließend in Anwesenheit oder Abwesenheit von BAPTA-AM (30 μ M) kultiviert und anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.8 Der Einfluss der Mikrodomänen bei der Glukose-stimulierten Gentranskription

In der Literatur sind viele unterschiedliche Hinweise darauf zu finden, ob die Lokalisation von Ca^{2+} innerhalb der Zelle und ihren Mikrodomänen bei der Genexpression eine Rolle spielt. Konträre Aussagen drehen sich um die Notwendigkeit von erhöhtem zytosolischem und/oder nukleärem Ca^{2+} zur Aktivierung der CRE- und SRE-Promoterelemente von Genen (Hardingham et al., 1997, 2001). Um die Bedeutung von zytosolischen und/oder nukleären Ca^{2+} -Mikrodomänen in Glukose-behandelten Insulinoma-Zellen zu untersuchen und vor allem zu unterscheiden, wurde das Ca^{2+} -Bindeprotein Parvalbumin (PV) als Fusionsprotein mit mCherry zur Pufferung gezielt im Zellkern oder Zytoplasma exprimiert. Durch andere Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass durch Anwenden dieser Methode die lokalen Ca^{2+} -Signale um mehr als 50% verringert werden konnten (Pusl et al., 2002), (Rodrigues et al., 2007).

Die modulare Darstellung des PVMCherry Fusionsproteins, das entweder zur Expression im Zytosol das Kernexportsignal der MKK1 oder zur Expression im Kern das Kernlokalisierungssignal des *SV40 large T antigen* enthält, ist in Abbildung 41A gezeigt. Zur

Kontrolle wurden die Zellen mit einem mCherry-kodierenden Lentivirus infiziert. Die Expression von mCherry sowie der beiden Fusionsproteine, NLS-PVmCherry und NES-PVmCherry, in dem jeweiligen Zellkompartiment nach lentiviraler Infektion mit den spezifischen Viren, ist in Abbildung 41B deutlich zu sehen. Das NES-PV-mCherry ist im Zytosol zu detektieren, während das NLS-PV-mCherry im Zellkern exprimiert wurde. Wenn die Glukose-induzierte Ca^{2+} -Erhöhung im Zytosol mittels der Expression des Parvalbumin-mCherry reduziert wurde, war die Glukose-induzierte Erhöhung der Reporter-gen-Transkription unter der Kontrolle des Kollagenase-, des c-Jun-, des c-Fos-, des Egr-1- und des CRE-regulierten Promotors signifikant erniedrigt. Die Pufferung des nukleären Calciums hatte keinen Effekt auf die Glukose-induzierte Transkription (Abbildung 41A-G). Folglich ist eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zur Signalweiterleitung zur Expressionsänderung in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen notwendig.

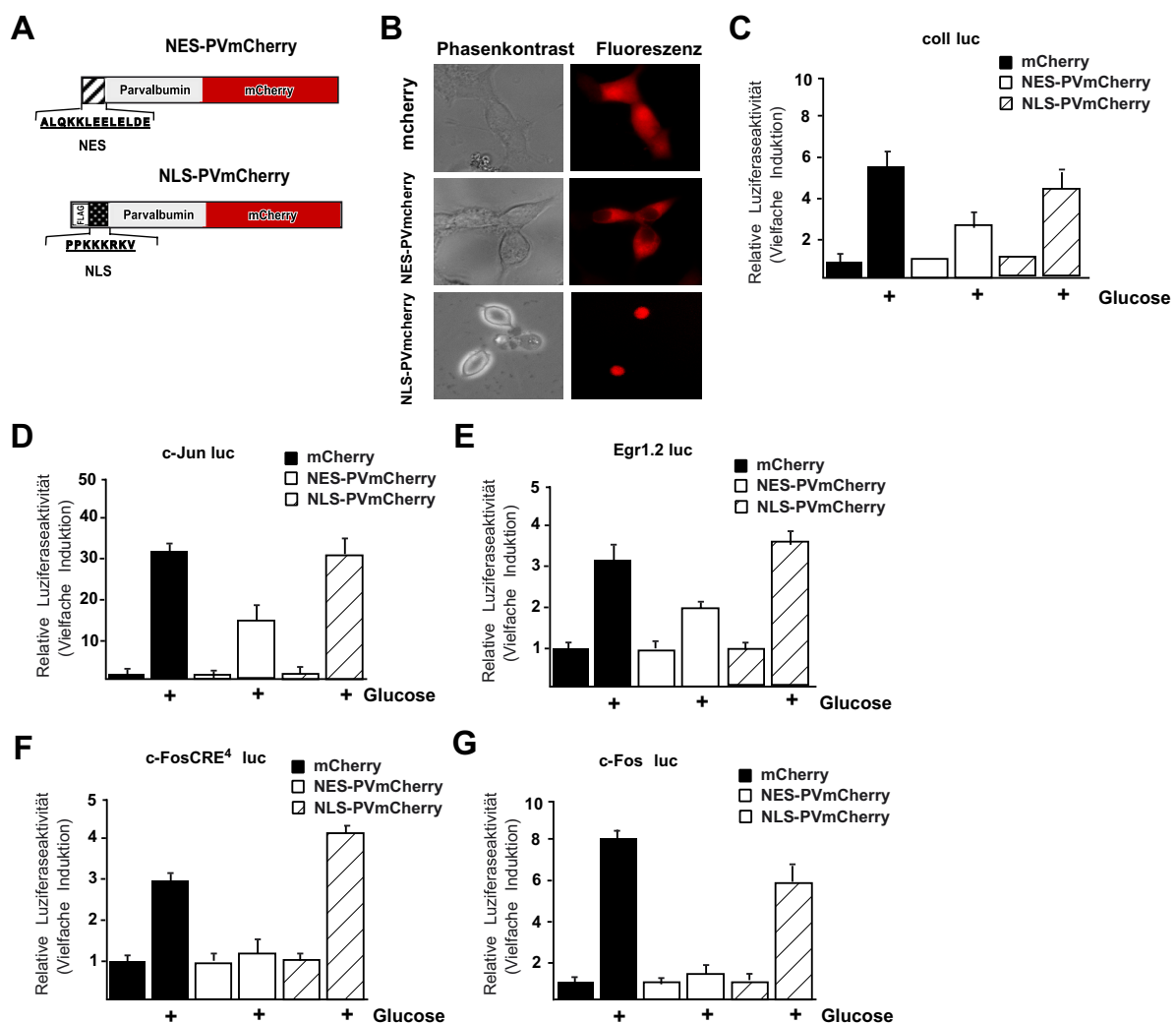


Abbildung 41: Die Bedeutung der Ca^{2+} -Mikrodomänen bei der Regulation der Transkription in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen

A: Schematische Darstellung des NES-PVmCherry und NLS-PVmCherry Fusionsproteins. B: Phasenkontrast sowie Fluoreszenzbilder von INS-1-Zellen, welche mit Lentiviren, die für mCherry (oben), NES-PVmCherry (Mitte) und NLS-mCherry (unten) kodierten, infiziert waren. C-F: INS-1

Insulinoma-Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren, die entweder für ein Kollagenase-Promoter (C)-, ein c-Jun-Promotor (D)-, c-Fos-Promotor (G)-, Egr-1-Promotor (E)- oder ein CRE-reguliertes Luziferase-Reportergen (F) kodieren, infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, welche entweder für mCherry, NES-PVmCherry oder NLS-mCherry kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Aus den vorangehenden Ergebnissen wurde deutlich, dass c-Jun bei Glukose-Stimulation in INS-1-Zellen verstärkt exprimiert wird, die c-Jun-Promotoraktivität zunimmt und dies abhängig von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration geschieht. Zur weiteren Bestätigung wurde die c-Jun Expression und Phosphorylierung im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, führte die Expression von Parvalbumin im Zytosol zur Inhibierung der Glukose-stimulierten c-Jun- und phospho-c-Jun-Expression. Die Expression von Parvalbumin im Zellkern hatte keine Auswirkung auf die Glukose-induzierte c-Jun-Expression in INS-1-Zellen. Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist demnach ein $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -reguliertes Gen.

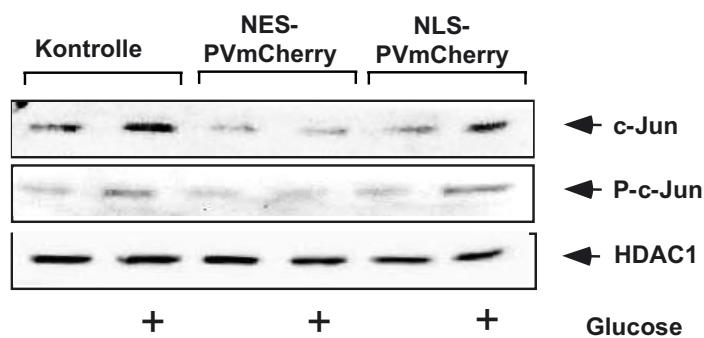


Abbildung 42: c-Jun, ein $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimuliertes Gen

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das mCherry markierte NLS- (NLS-PVmCherry) bzw. NES-Parvalbumin (NES-PVmCherry) kodieren. Als Kontrolle wurden mCherry-infizierte INS-1-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und mit Glukose (11 mM) für 2 h behandelt. Kernextrakte wurden präpariert und via Western Blot untersucht. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen c-Jun, die phosphorylierte Form von c-Jun oder zur Ladungskontrolle HDAC1 inkubiert.

3.1.2.9 Expression von Calumenin übt keinen Einfluss auf die Glukose-stimulierte Gentranskription in INS-1-Zellen aus

Ca^{2+} -speichernde Organelle besitzen zahlreiche Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Austauscher, welche der Änderung des Ca^{2+} -Signals bezüglich seiner Amplitude, Dauer und der Lokalisation dienen. Es wäre denkbar, dass das endoplasmatische Retikulum als bekannter Ca^{2+} -Speicher und -Spender bei der Anpassung der Ca^{2+} -Konzentration eine regulatorische Funktion übernehmen könnte. Mittels Überexpression von Calumenin, einem Ca^{2+} -Bindeprotein mit endogener HDEF-Sequenz am C-Terminus, die das Protein zur Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum befähigt, wurde die Rolle von Ca^{2+} in diesem Kompartiment

bei der Glukose-vermittelten Gentranskription untersucht. Calumenin verfügt über 6-7 EF-Hand-Motive, die es zur erhöhten Ca^{2+} -Bindung befähigen (Honoré, 2009). Diese Analyse zeigte, dass die doppelt-infizierten Zellen, welche Calumenin und das entsprechende Reporter gen exprimierten, keinen signifikanten Unterschied zur Glukose-stimulierten Genexpression in Kontroll-exprimierenden Insulinoma-Zellen aufwiesen (Abbildung 43). Die Überexpression von Calumenin hatte keine Auswirkung auf die Glukose-induzierte Expression in INS-1-Zellen. Demnach hat die Ca^{2+} -Konzentration im endoplasmatischen Retikulum keine besondere Bedeutung für die Glukose-vermittelten Transkription in INS-1-Zellen.

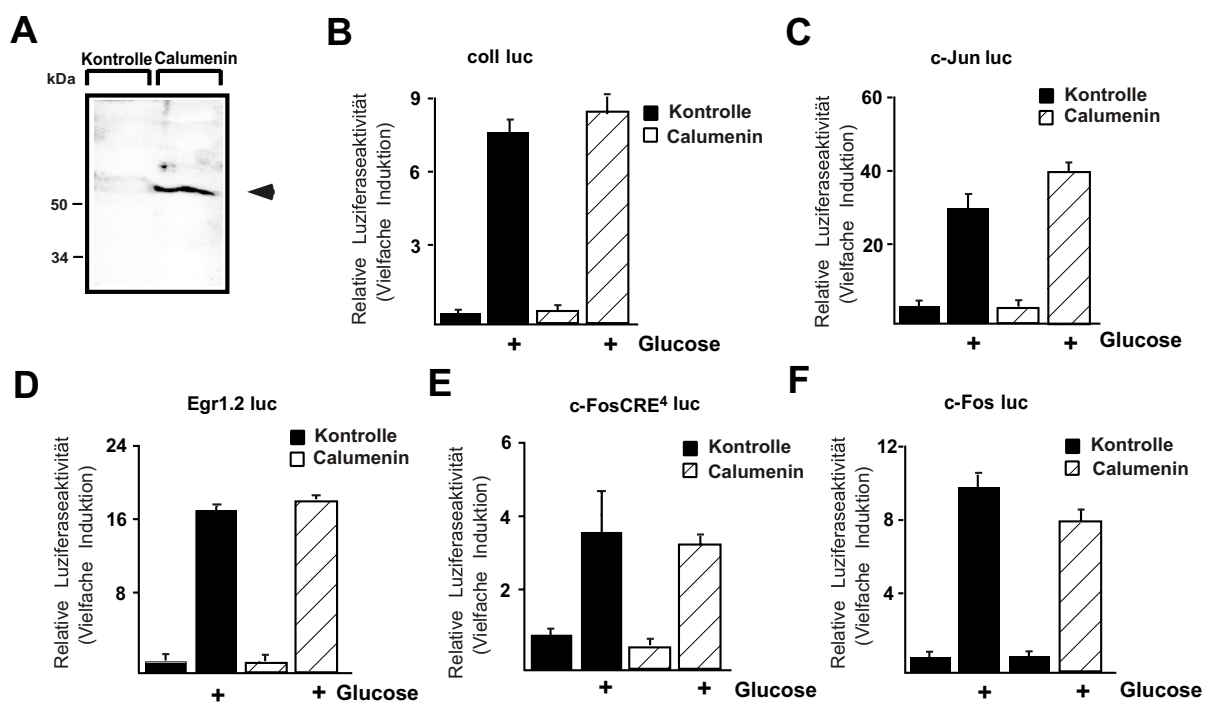


Abbildung 43: Überexpression von Calumenin hat keinen Effekt auf die Glukose-stimulierte Gentranskription in INS-1-Zellen

A: Nachweis von Calumenin im Western Blot: INS-1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Virus infiziert, der entweder für Calumenin oder für die Kontrolle kodierte, geerntet und die Kernextrakte im Western Blot mittels einem Antikörpers gegen Calumenin detektiert. B-F: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein Kollagenase-Promoter (B)/-, ein c-Jun-Promotor (C)/-, c-Fos-Promotor (F)/-, Egr-1-Promotor (D)/- oder ein CRE-reguliertes Luciferase-Reporter gen (E) kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, welche wie angezeigt entweder für die Kontrolle oder Calumenin kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.10 Expression des mitochondrialen Membranproteins Fis-1 beeinträchtigt die Glukose-induzierte Gentranskription in Insulinoma-Zellen

Die Insulinsekretion, eine Folge der Glukose-induzierten Ca^{2+} -Aktivierung in Insulinoma-Zellen, konnte durch die Überexpression des „Teilungs“- Proteins Fis-1 erniedrigt werden

(Park et al., 2008). Fis-1 bildet ein Teil der Fissionsmaschinerie und ist in der äußeren Membran der Mitochondrien verankert. Das Gleichgewicht zwischen der Fission (Zerfall) und Fusion (Verschmelzen) reguliert die Morphologie der Mitochondrien. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob das mitochondriale Membranprotein Fis-1 die Glukose-vermittelte Gentranskription in Insulin-sekretierenden INS-1-Zellen beeinträchtigt. Wie in Abbildung 44A zu sehen ist, konnte die Expression von Fis-1 in INS-1-Zellen, welche mit einem Fis-1 kodierendem Lentivirus infiziert wurden, im Western Blot detektiert werden. Die funktionellen Auswirkungen der Überexpression von Fis-1 in INS-1-Zellen auf die Glukose-stimulierte Genaktivierung wurden analysiert und in Abbildung 44B-F dargestellt: Die Glukose-regulierte Gentranskription der Reportergene, welche unter der Kontrolle entweder des Kollagenase-Promotors (B), des c-Jun-Promotors (C), des c-Fos-Promotors (F), des Egr-1- Promotors (D) oder des CRE-regulierten, künstlich hergestellten Promotors (E) stehen, wurde durch Expression von Fis-1 signifikant erniedrigt. Dies zeigt, dass das Fis-1 nicht nur einen Einfluss auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion, sondern auch auf die Glukose-stimulierte Gentranskription in Insulinoma-Zellen ausübt. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass Fis-1 einen Einfluss auf die Glukose-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung hat. Dies geschieht in erster Linie aufgrund eines mitochondrialen Ungleichgewichts (Park et al., 2008).

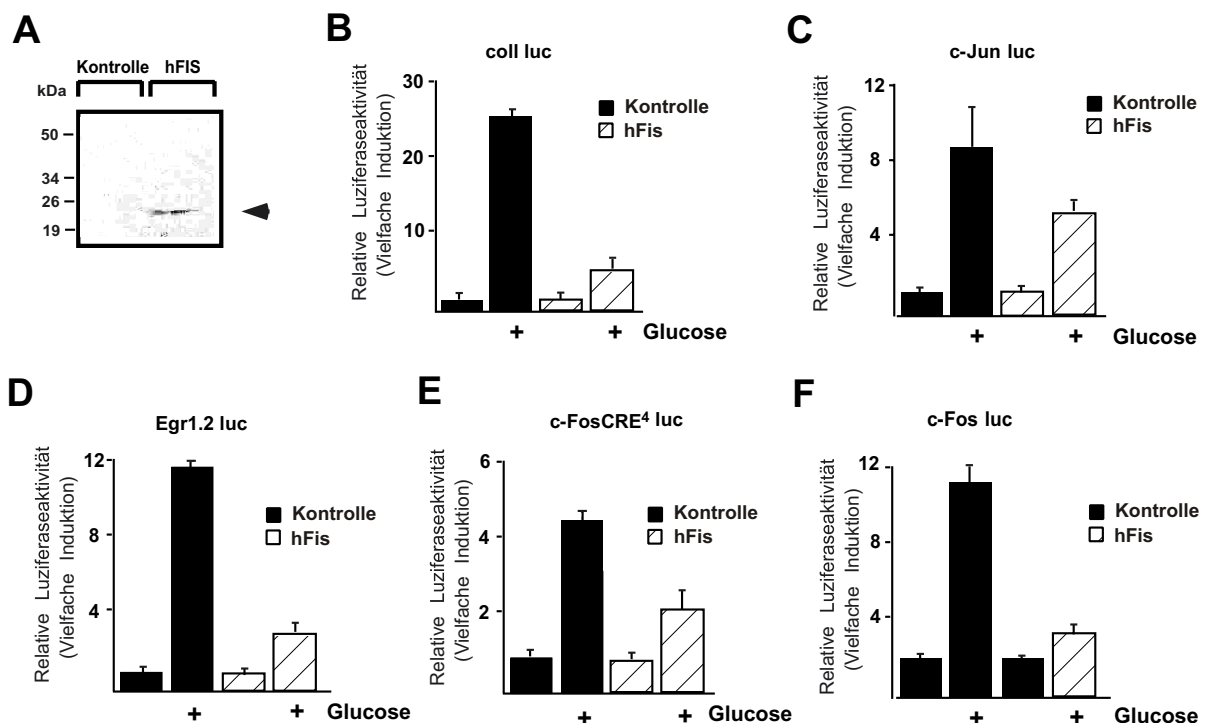


Abbildung 44: Expression des mitochondrialen Membranprotein Fis-1 vermindert die Glukose-induzierte Gentranskription in Insulinoma-Zellen

A: Western Blot-Analyse von INS-1-Zellen, welche mit einem rekombinanten Virus infiziert wurden, der entweder für Myc-markiertes Fis-1 oder für die Kontrolle kodiert. Die Kernextrakte wurden im

Western Blot mittels eines Antikörpers, der gegen das Myc-Tag gerichtet ist, detektiert. B-F: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein Kollagenase-Promotor (B), ein c-Jun-Promotor (C)/-, c-Fos-Promotor (F)/-, Egr-1-Promotor (D)/- oder ein CRE-reguliertes Luziferase-Reportergen (E) kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren doppelt infiziert, welche wie angezeigt entweder für die Kontrolle oder Fis-1 kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert, anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Die vorangehenden Ergebnisse bezüglich der Fis-1 Wirkung auf die Glukose-stimulierte Transkription sollten im Weiteren auf Proteinebene bestätigt werden: INS-1-Zellen wurden mittels eines lentiviralen Gentransfers mit einem Virus infiziert, der für Fis-1 kodiert. Die Zellextrakte wurden anschließend im Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen CREB, c-Fos, c-Jun oder die phosphorylierte Form von CREB oder c-Jun analysiert (Abbildung 45). Wie in Abbildung 45 zu sehen ist, führt die Expression von Fis-1 zur Inhibierung der Glukose-stimulierten c-Jun- und c-Fos- Expression, sowie der Phosphorylierung von c-Jun und CREB. Das Expressionslevel von CREB hingegen blieb, wie zu erwarten war, stabil.

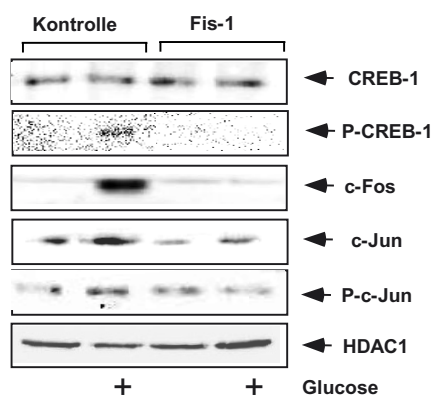


Abbildung 45: Expression von Fis-1 vermindert die Glukose-induzierte Genexpression in Insulinoma-Zellen

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder für Myc-markiertes Fis-1 oder für den lentiviralen Transfervektor pFUW (Kontrolle) kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und mit Glukose (11 mM) für 2 h behandelt. Kernextrakte wurden präpariert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen CREB, c-Fos, c-Jun oder die phosphorylierte Form von CREB oder c-Jun oder HDAC1 als Ladungskontrolle, wie angegeben, inkubiert.

3.1.2.11 Die Glukose-induzierte Erhöhung der Gentranskription in INS-1-Zellen bedarf der Aktivierung von ERK

Es wurde bereits gezeigt, dass die Glukose-Stimulation zur Aktivierung von ERK in β -Zellen des Pankreas führt (Arnette et al., 2003), (Frödin et al., 1995). Des Weiteren ist die Aktivierung von ERK zur Erhöhung der Egr-1 Expression in INS-1-Zellen notwendig (Mayer & Thiel, 2009). In diesem Kontext konnte hier gezeigt werden, dass die ERK-Aktivierung eine Erhöhung der AP-1-Aktivität hervorruft (3.1.1.4, 3.1.1.5). Im Gegensatz dazu wurde

postuliert, dass die c-Jun-vermittelte Transkription, welche durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle aktiviert wird, unabhängig von der ERK-Aktivierung in Zellen der Hypophyse ist (Cruzalegui et al., 1999). Aus diesen Gründen wurde die Rolle von ERK bei der Glukose-induzierten Aktivierung des c-Jun-Promotors in Insulinoma-Zellen genauer untersucht. Die INS-1-Zellen wurden dafür mit dem MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 (3.1.1.4, Abbildung 26) vorbehandelt. Wie in Abbildung 46 A zu sehen ist, konnte die Behandlung der infizierten INS-1-Zellen mit PD98059 wirksam die Glukose-stimulierte Transkription des c-Jun-Promotor/Luziferase-Reportergens inhibieren. Es konnte bestätigt werden, dass der MAP-Kinase Kinase Inhibitor die Egr-1-Promotor/Luziferase-Reportergen Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen vollständig hemmt (Abbildung 46 B). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die CRE-vermittelte Reporter-Expression in INS-1-Zellen als Folge einer Stimulation mit Glukose von MEK und ERK abhängig ist (Abbildung 46 C).

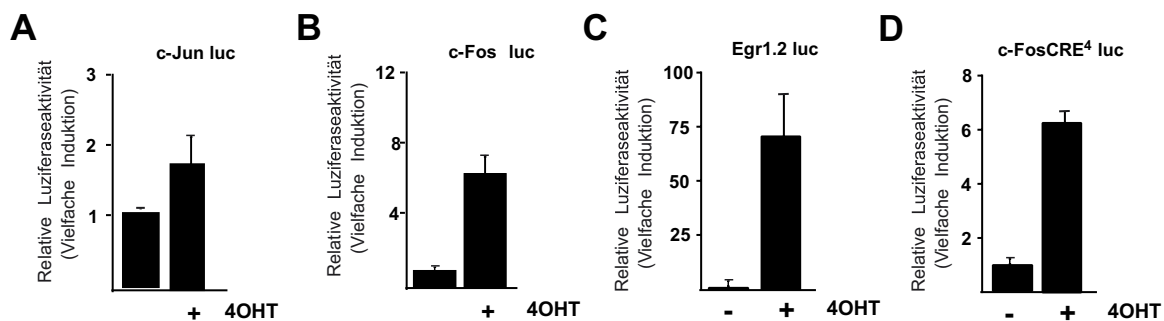


Abbildung 46: ERK spielt eine essentielle Rolle bei der Regulierung der verstärkten Transkription in Glukose-stimulierten INS-1 β -Zellen des Pankreas

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der entweder für ein c-Jun-Promotor/, Egr-1-Promotor/ oder CRE-aktivierbares Luziferase-Reportergen kodiert, infiziert. Die Zellen wurden für 24 h Glukos-reduziert (2 mM). Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von PD98059 (50 μ M) für 48 h kultiviert und anschließend mit Glukose (11 mM) für 48 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Glukose aktiviert den ERK-Signalweg hauptsächlich über die Aktivierung von B-Raf (Duan & Cobb, 2010). Durch die Verwendung einer stabil hergestellten INS-1 Zelllinie, welche induzierbar die aktive Form von B-Raf (Δ B-Raf:ER) exprimiert, konnte gezeigt werden (3.1.1.5), dass die AP-1 vermittelte Reporter-Gen-Aktivität bei Expression der B-Raf-Mutante enorm zunimmt. Dies konnte durch Vorbehandlung mit PD98059 reduziert werden. Von daher war es interessant, die Regulation des c-Jun-, c-Fos-, Egr1- sowie des CRE-regulierten Promotors zu untersuchen. Die INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen wurden für 24 h mit dem 4OHT stimuliert. In Abbildung 47A-D ist zu sehen, dass alle vier untersuchten Promotoren durch Aktivierung von B-Raf stark stimuliert vorlagen. Somit wurde deutlich, dass eine Aktivierung von ERK die c-Jun, Egr-1 und CRE-regulierte Gentranskription in INS-1-Zellen aktiviert. Die Aktivierung von MEK und ERK verbindet folglich die Glukose-Stimulation mit der verstärkten Transkription in Insulinoma-Zellen.

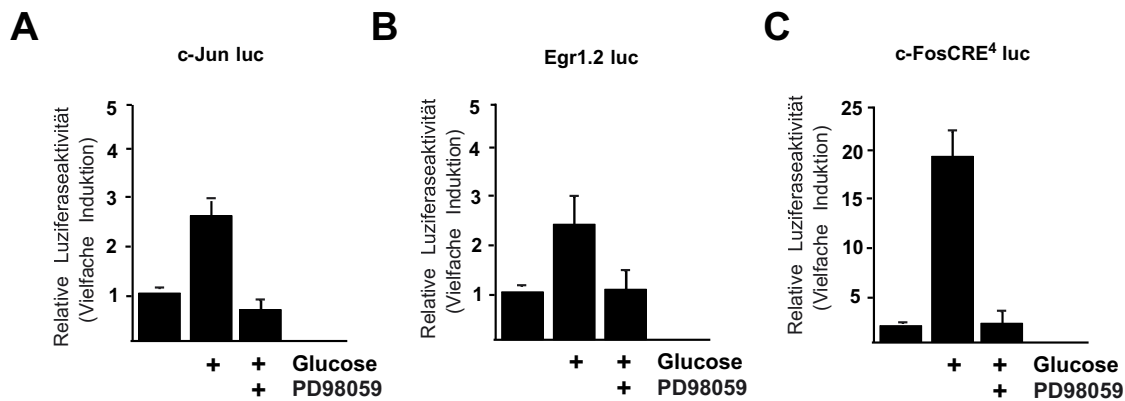


Abbildung 47: Bedeutung von ERK für die erhöhte Transkription in Glukose-stimulierten INS-1 β -Zellen des Pankreas

A-D: INS-1/ Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus, der entweder für ein c-Jun-Promotor (A)/, c-Fos-Promotor (B)/-, Egr-1-Promotor (C)/ oder CRE-aktivierbares Promotor/Luziferase-Reportergen (D) kodierte, infiziert. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert. Die Zellen wurden mit 4OHT (250 nM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.1.2.12 Erhöhung der CRE-regulierten Genexpression ist unabhängig von PKA in Glukose-behandelten Insulinoma-Zellen

Von einer Arbeitsgruppe wurde postuliert, dass die Ca^{2+} -induzierte CREB-Transkription die Aktivierung der PKA voraussetzt (Impey et al., 1998). Deswegen wurde untersucht, ob eine Aktivierung von PKA zur erhöhten CRE-vermittelten Reportergen-Aktivität in Glukose-behandelten INS-1-Zellen notwendig ist. PKA ist eine Serin/Threonin-Kinase, die CREB phosphorylieren kann. Durch Inhibition der PKA wurde der Einfluss dieser Kinase in der Glukose induzierten Ca^{2+} -regulierten Signalkaskade auf den CRE-regulierten Promotor untersucht. Zur Inaktivierung der PKA wurde ein nukleärer PKA-Inhibitor verwendet, welcher die Aminosäuren 1-31 des PKA-Inhibitors PKI besaß (Abbildung 48A). Die Überexpression des GST-PKI-Fusionsproteins wurde zur Aufklärung der Rolle von PKA in der untersuchten Kaskade eingesetzt (Olsen & Uhler, 1991). In Abbildung 48B ist zu sehen, dass das Fusionsprotein nach lentiviraler Infektion mit dem GST-PKI-kodierenden Virus exprimiert wurde. Die funktionelle Auswirkung einer solchen Expression auf den untersuchten CRE-regulierten Promotor ist in Abbildung 48D zu sehen und zeigt, dass die Glukose-induzierte Erhöhung der CRE-vermittelten Transkription nicht durch die Inhibierung der PKA beeinträchtigt wird. Zur Kontrolle wurden die infizierten Zellen mit Forskolin/IBMX stimuliert (Abbildung 48C): Wie zu erwarten, wurde die Forskolin-stimulierte CRE-vermittelte Promotoraktivität durch die Expression des Fusionsproteins GST-PKI inhibiert. Diese Daten zeigen, dass die PKA nicht für die Glukose-stimulierte CRE-bedingte Genexpression in INS-1-Zellen notwendig ist.

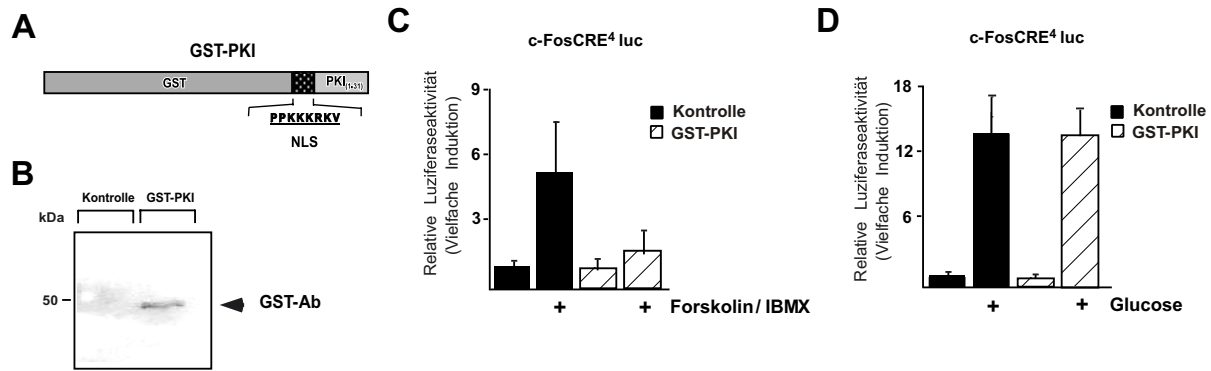


Abbildung 48: PKA spielt keine Rolle bei der CRE-regulierten Gentranskription in INS-1-Zellen nach Glukose-Stimulation

A: Schematische Darstellung des GST-PKI Fusionsproteins. B: Western Blot-Analyse von INS-1-Zellen, welche mit einem rekombinanten Virus infiziert wurden, der entweder für GST-markiertes PKI für den lentiviralen Transfervektor pFUW (Kontrolle) kodiert und anschließend geerntet wurden. Die Kernextrakte wurden im Western Blot mittels eines Antikörpers gegen das GST-Tag gerichtet, detektiert. C, D: INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für ein CRE-reguliertes Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, welche entweder für die Kontrolle oder GST-PKI kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert, anschließend mit Glukose (D) für 48 h oder mit Forskolin (20 μ M)/IBMX (0,5 mM) (C) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

Diese Resultate bezüglich PKA-Wirkung auf die Glukose-stimulierte Transkription konnten auf Proteinebene bestätigt werden: INS-1-Zellen wurden mittels eines lentiviralen Gentransfers mit einem Virus infiziert, der für das GST-PKI Protein kodiert. Die Zellextrakte wurden anschließend im Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen c-Fos und c-Jun analysiert (Abbildung 49). Wie in Abbildung 49B zu sehen ist, führt die Expression des PKA-Inhibitors zur Inhibierung der Forskolin-stimulierten c-Jun- und c-Fos- Expression. Das c-Jun-Expressionslevel nach Glukose-Stimulation bleibt hingegen, wie zu erwarten war, stabil (Abbildung 49A). Die bZIPs c-Jun sowie c-Fos scheinen demnach durch die PKA-unbeeinflussbare Gene bei der Glukose-Signalkaskade in INS-1-Zellen zu sein.

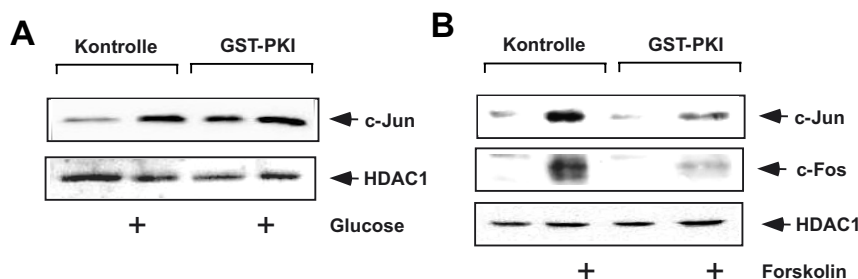


Abbildung 49: Die Expression des PKA Inhibitors GST-PKI übt keinen Effekt auf die Glukose-induzierte Genexpression in Insulinoma-Zellen aus

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die entweder für GST-markiertes PKI oder für das Kontrollplasmid kodieren. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM Glukose) und mit Glukose (A) oder Forskolin/IBMX (B) für 2 h behandelt. Kernextrakte wurden präpariert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen c-Fos, c-Jun oder HDAC1 als Ladungskontrolle, wie angegeben, inkubiert.

3.2 Signaltransduktion von Pregnenolonsulfat in Insulinoma-Zellen

3.2.1 Stimulierung der INS-1-Zellen mit Pregnenolonsulfat induziert die Biosynthese von Egr-1

Aus den letzten Versuchen ist hervorgegangen, dass die Egr-1 Aktivität durch Glukose erhöht wird. Eine ähnliche Wirkungsweise scheint Pregnenolonsulfat auf die Egr-1 Biosynthese zu haben.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die INS-1 auf Pregnenolonsulfat-Stimulation mit einem schnellen Ca^{2+} -Einstrom reagiert (Wagner et al., 2008). Und der Zinkfinger Egr-1 ein Ca^{2+} -regulierter Transkriptionsfaktor ist (Thiel et al., 2010). Eine Stimulierung der INS-1-Zellen mit Pregnenolonsulfat induzierte die Biosynthese von Egr-1 (Mayer et al., 2011). Es stellte sich die Frage, welche Art von Ca^{2+} -Kanälen bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Signalkaskade aktiviert werden. Als potentielle Kandidaten wurden L-Typ-spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle und TRPM3-Kanäle ermittelt (Mayer et al., 2011). Es stellte sich heraus, dass eine bedingte Aktivierung beider Ca^{2+} -Kanäle zur Pregnenolonsulfat-vermittelten Transkription von der Glukosekonzentration des Mediums abhängt. Nun wurde postuliert, dass bei niedrigem Glukose-Level eine Aktivierung der TRPM3-Kanäle zur Depolarisation und Signalweiterleitung benötigt wird, während bei höherer Glukosekonzentration eine Aktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zur Signalweiterleitung ausreicht. Dies gilt es nun zu verifizieren.

Zum Vergleichen der bereits analysierten Glukose-Signalkaskade sollte die Pregnenolonsulfat-induzierte Egr-1 Expression via Ca^{2+} -Influx in Insulinoma-Zellen bestätigt werden. Der Aufbau von Egr-1 ist in Abbildung 50 zu sehen.

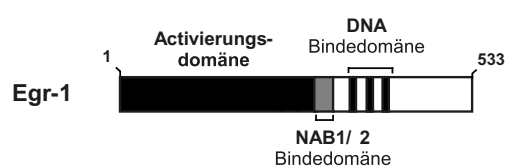


Abbildung 50: Zinkfinger Egr-1

Schematische Darstellung der modularen Struktur von Egr-1 Wildtyp. Die N-terminale Aktivierungsdomäne und die Zinkfinger DNA-Bindedomäne sind eingezeichnet.

Zum Nachweis der Egr-1-Biosynthese wurden INS-1-Zellen für 24 h in 2 mM und 11 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert. Die Zellen wurden in Medium mit 11 mM und 2 mM Glukose für 1 h mit Pregnenolonsulfat (50 μM) (Abbildung 51) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, Kernextrakte präpariert und die Egr-1 Expression mittels Western Blot analysiert. Wie zu sehen ist, stimuliert Pregnenolonsulfat eine Erhöhung der Egr-1-Biosynthese – sowohl in Medium mit 2 mM Glukose als auch mit 11 mM Glukose.

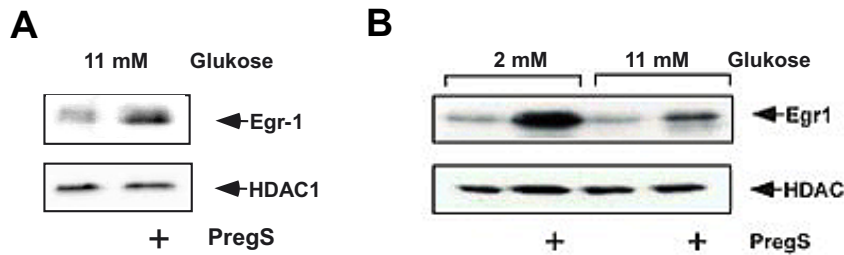


Abbildung 51: Pregnenolonsulfat induziert Egr-1 Biosynthese in INS-1-Zellen

A, B: Nachweis der Egr-1 Biosynthese in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert 2 mM bzw 7 mM und für 1 h mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) stimuliert. Kernextrakte wurden aus geernteten Zellen lysiert und mittels einer Western Blot-Analyse analysiert, wobei ein Egr-1 spezifischer Antikörper verwendet wurde. Zur Ladekontrolle diente der HDAC1-Antikörper.

3.2.2 Stimulation mit Pregnenolonsulfat erhöht die Egr-1-mRNA Konzentration von isolierten Inseln des Pankreas

Um aufzuzeigen, dass Pregnenolonsulfat in gleicher Weise die Egr-1 Expression in primär kultivierten Zellen des endokrinen Pankreas aktiviert, wurden Inseln des Pankreas aus der Maus isoliert und die β -Zellen vorübergehend in Kultur gehalten. Die Zellen wurden nach Serumreduktion (24 h, 1%-FCS-haltiges RPMI) mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) für 1 h stimuliert, die RNA isoliert, und diese dann revers transkribiert. Die Genexpression wurde mittels einer quantitativen Realtime-PCR bestimmt.

Abbildung 52 zeigt, dass die Stimulation mit Pregnenolonsulfat deutlich die Egr-1 mRNA-Konzentration erhöht.

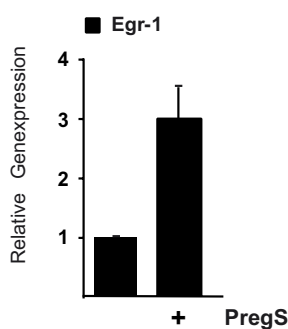


Abbildung 52: Pregnenolonsulfat induziert Egr-1 Biosynthese in isolierten β -Zellen der Maus

Quantitative real-time PCR der revers-transkribierten mRNA von isolierten β -Zellen aus dem murinen Pankreas in Kurzzeitkultur. Nach Serumreduktion der Zellen (1% FCS) wurden die Zellen für 1 h mit Pregnenolonsulfat stimuliert (50 μ M) Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen des Pankreas. Das Egr-1 Signal wurde auf das β -Actin-Signal normalisiert und mit Hilfe der $\Delta\Delta C_Q$ -Auswertung die vielfache Induktion bestimmt.

3.2.3 TRPM3 ist für eine Pregnenolonsulfat-stimulierte Egr-1-Expression der in 2 mM-Glukose-haltigem Medium kultivierten INS-1-Zellen erforderlich

Eine Aktivierung der TRPM3-Kanäle bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Signalentstehung in INS-1-Zellen ist notwendig, wenn die Zellen in 2mM-Glukose-haltigem Medium kultiviert wurden (Mayer et al., 2011). Im Widerspruch zu veröffentlichten Daten (Wagner et al., 2008) spielt TRPM3 keine signifikante Rolle bei INS-1-Zellen, die in Medium kultiviert wurden, das 11 mM Glukose enthält. Zur Bestimmung der Rolle der TRPM3-Kanäle in der Signaltransduktion, welche zur verstärkten Egr-1-Expression in INS-1-Zellen führt, haben wir eine TRPM3-spezifische shRNA in INS-1-Zellen mit lentiviralem Gentransfer eingebracht. Als Kontrolle wurde ATF2-spezifische shRNA exprimiert. Der Provirus enthält neben der Transkriptionseinheit zur Expression der shRNAs eine zweite Transkriptionseinheit, welche EGFP unter Kontrolle eines aus dem Zytomegalievirus stammenden Promotor/Enhancer kodiert. Die Expression von EGFP diente zur Bestimmung die Infektionsrate nach lentiviralem Gentransfer und zum Nachweis des exprimierten Transgens.

Um die Rolle von TRPM3 in der Signalkaskade zu bewerten, welche zur verstärkten Egr-1 Expression nach Pregnenolonsulfat-Stimulation führt, wurden INS-1-Zellen verwendet, die eine shRNA spezifisch für TRPM3 oder ATF2 exprimierten. Die infizierten Zellen wurden in Medium mit entweder 2 oder 11 mM Glukose kultiviert. Abbildung 53B zeigt, dass die erhöhte Egr-1 Expression durch Expression der TRPM3-spezifischen shRNA in INS-1-Zellen in 2 mM Glukose wesentlich gehemmt wurde.

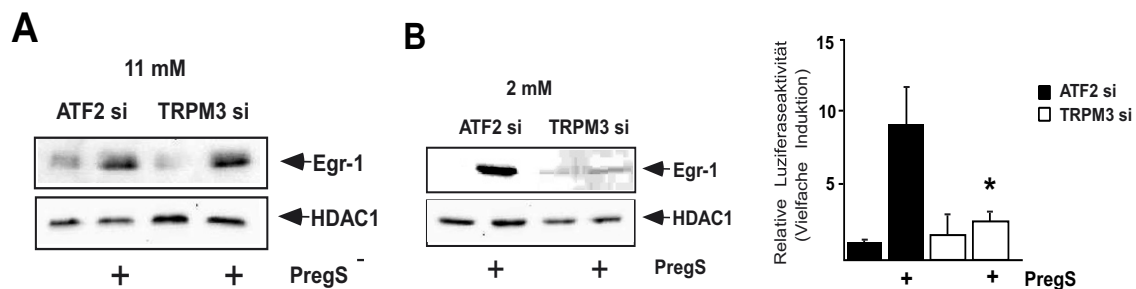


Abbildung 53: Die TRPM3-Aktivierung ist für die Pregnenolonsulfat-vermittelte Egr-1 Expression in INS-1-Zellen mit 2mM Glukose im Kultivierungsmedium notwendig

A, B: INS-1 wurden in Medium mit entweder 2 mM (A) oder 11 mM Glukose (B) im Medium kultiviert und mit Lentiviren infiziert, die für eine spezifische TRPM3- oder ATF2-shRNA kodieren. Die Zellen wurden 24 h in 2 mM bzw. 11 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit Pregnenolonsulfat (50 μM) für 1 h stimuliert. Die Kernextrakte wurden isoliert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen Egr-1 analysiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper. B, rechts: Quantifizierung der in B, links, erhaltenen Western Blots; $P=0,037$.

Diese Daten zeigen, dass eine TRPM3-Aktivierung von TRPM3 nur bei 2 mM Glukose-haltigem Medium an der Signalkaskade beteiligt ist, die zur Biosynthese von Egr-1 aufgrund einer Stimulation mit Pregnenolonsulfat führt. Dies lässt vermuten, dass eine weitere

Komponente der Plasmamembran – vor allem bei erhöhter Glukosekonzentration – das Pregnenolonsulfat-Signal in die Zellen weitervermittelt.

3.2.4 Hemmung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle blockiert die Pregnenolonsulfat-induzierte Expression von Egr-1 in INS-1 Insulinoma-Zellen

Die Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle ist für die Glukose-Signaltransduktion in β -Zellen des Pankreas notwendig. In Neuronen hat sich gezeigt, dass Pregnenolonsulfat diese spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle (Chen & Sokabe, 2005) aktiviert. Angesichts der Tatsache, dass TRPM3-Kanäle nur bei 2 mM Glukosekonzentration im Medium zur Signalvermittlung für die Pregnenolonsulfat-induzierte Kaskade in INS-1-Zellen eine Rolle spielt, wurden des weiteren die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle untersucht.

Eine Stimulation der β -Zellen mit KCl zur Kontrolle führt zur erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Satin, 2000). Die Stimulation mit KCl wurde verwendet. In Abbildung 54A ist zu sehen, dass Egr-1 exprimiert wird, wenn die Zellen mit KCl behandelt wurden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal-Blocker Nifedipin oder Verapamil inhibierte vollständig die Biosynthese von Egr-1, welche auf die Stimulation der Zellen mit KCl folgte (Abbildung 54A).

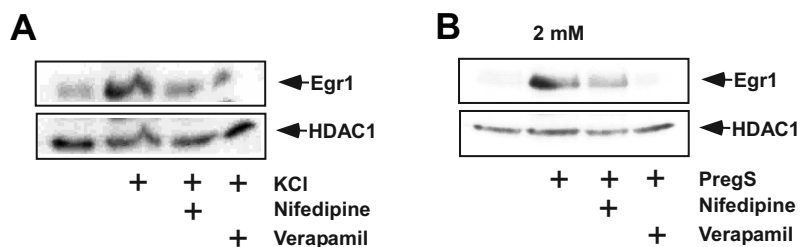


Abbildung 54: Die Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle ist für die Pregnenolonsulfat-induzierte Egr-1 Genexpression notwendig

A, B: Egr-1 Biosynthese in KCl (A)- bzw. Pregnenolonsulfat (B)-stimulierten INS-1 Insulinoma-Zellen. Zellen wurden für 24 h bei 2 mM Glukose-reduziert und für 1 h mit KCl (25 mM) bzw. Pregnenolonsulfat (50 μM) stimuliert, Kernextrakte isoliert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen Egr-1 analysiert. Als Ladungskontrolle dienten der HDAC1-Antikörper. Die KCl (A)- bzw. Pregnenolonsulfat (B)- induzierte Egr-1 Expression wurde durch Vorinkubation mit den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal-Inhibitoren Nifedipin (50 μM) or Verapamil (50 μM) beeinträchtigt.

Als nächstes wurde die Bedeutung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle für die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung von Egr-1 in INS-1-Zellen analysiert. Wie Abbildung 54B zeigt, wurde Pregnenolonsulfat-induzierte Egr-1 Expression in INS-1 in 2 mM-Glukose Medium durch Preinkubation der Zellen mit Nifedipin oder Verapamil blockiert. Diesen Effekt konnte auch für Zellen in 11 mM Glukose-haltigem Medium gezeigt werden (Mayer et al.,

2011). Diesen Daten verdeutlichen, dass spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle für die Pregnenolonsulfat-bedingte Egr-1-Biosynthese in INS-1 Insulinoma-Zellen erforderlich sind. Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass TRPM3-Kanäle sowie spannungsgesteuerte L-Typ-Kanäle zur Expression von Egr-1 in 2 mM Glukose-kultivierten INS-1-Zellen benötigt werden, während bei einer Erhöhung der Glukosekonzentration auf 11 mM die Aktivierung von spannungsgesteuerten L-Typ-Kanälen zur Pregnenolonsulfat-induzierten Egr-1 Biosynthese ausreicht.

3.2.5 Expression von TRPM3 und die spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in isolierten Inseln, Insulinoma-Zellen und hypophysären Zellen

AtT20 corticotrope Zellen wurden verwendet, um die Rolle der beiden untersuchten Kanal-Subtypen, $\text{Ca}_v1.2$ und TRPM3, weiter zu studieren. Mittels einer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass in dieser Zelllinie der spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanal Subtyp $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$, aber fast kein TRPM3 exprimiert wird (Abbildung 55C), wie durch eine PCR, auch mit mehr PCR-Zyklen, gezeigt werden konnte. Zur Kontrolle wurden hypophysäre GH3 Zellen (Tashjian et al., 1970), INS-1-Zellen sowie isolierte Inseln aus dem murinen Pankreas analysiert. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, konnte die Expression von TRPM3 und die Ca^{2+} -Kanal-Subtypen $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ in Inseln, INS-2 sowie den GH3-Zellen nachgewiesen werden.

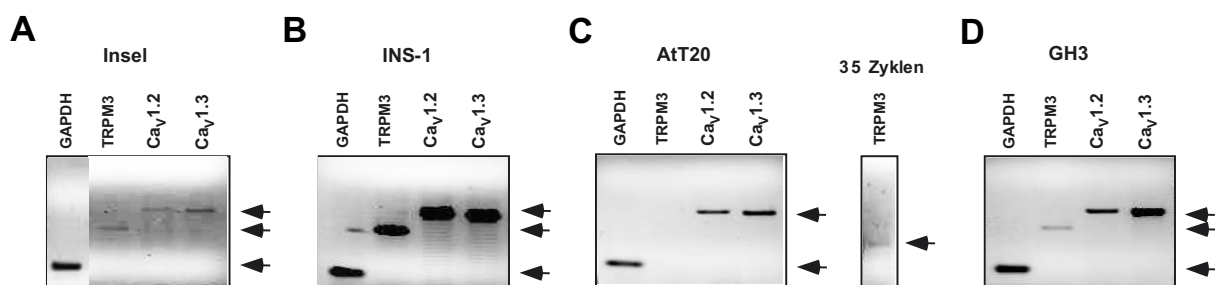


Abbildung 55: Expression von TRPM3, $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ in murinen Inseln, INS-1 Insulinoma-Zellen und hypophysären AtT20 und GH₃-Zellen

RNA wurde aus frisch isolierten murinen Inseln, INS-1 Insulinoma-Zellen, hypophysäre und corticotrope Zellen extrahiert. Die Expression von TRPM3, $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$ wurde mittels RT-PCR mit Gen-spezifischen Primern bestimmt. GAPDH-spezifische Primer wurden dabei als interne Referenz verwendet.

Aufgrund dieser Ergebnisse dienten AtT20 Zellen zur Beantwortung der Frage, ob die Expression spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle zur Aktivierung der Transkription nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat ausreicht. In Abbildung 56 ist zu sehen, dass AtT20 Zellen über funktionale, spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle verfügen: Eine Stimulation mit KCl/FPL erhöhte die Transkription des Kollagenase-Promotor/Reportergens, welche durch die Preinkubation mit Verapamil geblockt werden konnte (Abbildung 56A). Dies bestätigt, dass

dieser Effekt auf die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte eine Stimulation mit Pregnenolonsulfat keine signifikante Steigerung der AP-1 Aktivität in diesen Zellen erzielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen nicht ausreicht, um eine Transkriptionsänderung nach Pregnenolonsulfat-Stimulation zu erhalten. Eine Western Blot-Analyse (Abbildung 56B) zeigte, dass eine Stimulation mit Pregnenolonsulfat keine verstärkte c-Fos und c-Jun-Expression in AtT20 Zellen induzierte, während durch die Stimulation mit KCl/FPL eine deutliche Biosynthese von c-Fos und c-Jun stattfand.

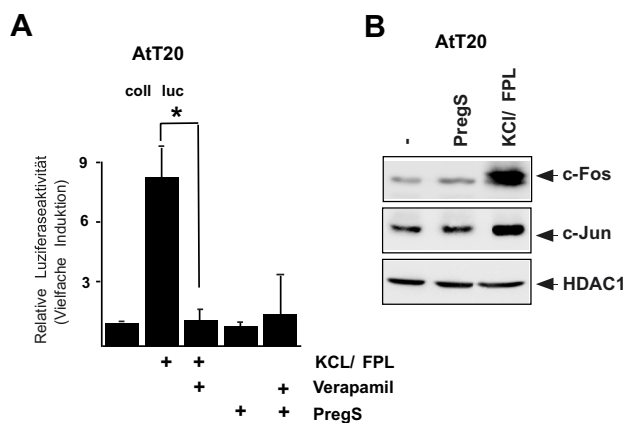


Abbildung 56: Stimulation mit KCl/FPL und Pregnenolonsulfat beeinflusste AP-1 Aktivität und c-Fos sowie c-Jun Expression in hypophysären Zellen

A: AtT20 Corticotrophe Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodieren, infiziert. Die Zellen wurden 24 h serumgehungert und anschließend in An- oder Abwesenheit von Verapamil mit Pregnenolonsulfat oder KCl/FPL (25 mM, 5 μM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. B: AtT20 corticotrophe Zellen wurden für 24 h Serum-reduziert und für 1 h mit Pregnenolonsulfat oder KCl/FPL (25 mM, 5 μM), wie angegeben, stimuliert. Kernextrakte wurden isoliert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen c-Fos oder c-Jun analysiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC-1 Antikörper.

Als weiteres Kontrollexperiment wurden nun die TRPM3-armen AtT20 Zellen mit Lentiviren infiziert, die für die TRPM3 spezifische shRNA oder die Kontrolle kodieren und die Auswirkung auf die AP-1 vermittelte Transkription nach Stimulation mit KCl/FPL oder Pregnenolonsulfat wurde untersucht. Die TRPM3-Inhibierung übte wie erwartet keinen Effekt auf die AP-1-vermittelte Expression des Luziferasegens nach Depolarisation mit FPL/KCl (Abbildung 57A) oder Stimulation mit Pregnenolonsulfat aus (Abbildung 57B).

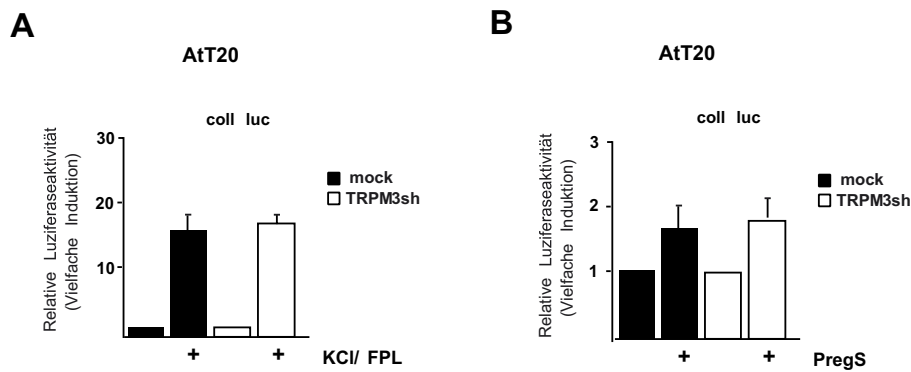


Abbildung 57: Die AP-1-kontrollierte Transkription in corticotropen AtT20 Zellen wird nicht durch Knock-Down der TRPM3-Expression beeinflusst

INS-1-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für eine spezifische TRPM3-shRNA oder Mock kodieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Virus, der für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen kodiert, doppelt infiziert. Zellen wurden für 24 h Serum-reduziert und entweder mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) (A) oder mit KCl (25 mM)/FPL (5 μ M) (B) für 24 h stimuliert. Die Kernextrakte wurden isoliert und die Luciferaseaktivität bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration normalisiert wurde.

Die Experimente zeigen, dass durch Fehlen oder bei Hemmung der TRPM3-Kanäle eine erniedrigte Pregnenolonsulfat-induzierte Genexpression zu beobachten ist. Daraus lässt sich schließen, dass TRPM3-Kanäle zum Pregnenolonsulfat-induzierten Ca^{2+} -Einstrom bei geringer Membrandepolarisation benötigt werden.

3.2.6 Pregnenolonsulfat aktiviert AP-1 und bZIP-Transkriptionsfaktoren in Insulinoma-Zellen

Erhöhte Glukose-Konzentrationen üben einen tiefgreifenden Effekt auf die Gentranskription aus (Glauser et al., 2006), wie in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der AP-1-Aktivität in INS-1-Zellen bereits gezeigt wurde (3.1.1). Die Untersuchung zur Pregnenolonsulfat-Signalkaskade zeigt, dass Pregnenolonsulfat zur Egr-1-Aktivierung führt und somit ebenfalls einen Effekt auf die Genexpression ausübt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass durch Pregnenolonsulfat eine Signalkaskade in Insulinoma-Zellen induziert wird, welche der Glukose-initiierten Signalkaskade in den β -Zellen sehr ähnelt, war es im Weiteren von Interesse herauszufinden, ob eine Stimulation mit Pregnenolonsulfat neben der Egr-1 Biosynthese ebenso die AP-1 und bZIP-Aktivität in Insulinoma-Zellen erhöhen kann. Die folgenden Untersuchungen mit Pregnenolonsulfat wurden auf die Analyse in 2 mM Glukose-haltigem Medium beschränkt.

Zur Messung der AP-1 Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten Zellen, wurde mittels lentiviralem Gentransfer ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reporter gen ins Chromatin der INS-1-Zellen integriert (Abbildung 22A). Die infizierten Zellen wurden anschließend für 24 h Glukose (2 mM)-reduziert und mit Pregnenolonsulfat, Pregnenolon oder Progesteron für 24

h stimuliert. In Abbildung 58 ist zu sehen, dass die AP-1 vermittelte Transaktivierung des Reportergens durch Stimulation mit Pregnenolonsulfat verstärkt, hingegen durch Pregnenolon und Progesteron keine Aktivierung festgestellt wurde. Bis auf geringe Variationen der vielfachen Induktion aufgrund experimenteller Gegebenheiten verdeutlichen diese Daten, dass Pregnenolonsulfat die Genetik von INS-1-Zellen ändert, indem es AP-1 kontrollierte Gene aktiviert.

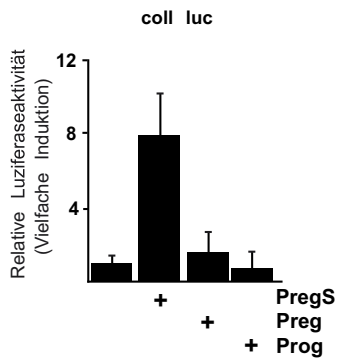


Abbildung 58: Erhöhte AP-1 Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen

INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen kodierten. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert 2 mM und anschließend mit Pregnenolonsulfat, Pregnenolon oder Progesteron für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.7 Erhöhung der c-Jun und c-Fos-Expression in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen und isolierten β -Zellen aus dem Pankreas

Das AP-1 Protein wurde ursprünglich als Heterodimer von c-Fos und c-Jun beschrieben (Chiu et al., 1988). Deswegen wurde die Expression und biologische Aktivität von c-Fos und c-Jun in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen untersucht. In Abbildung 59A ist zu sehen, dass die Biosynthese dieser bZIP-Proteine nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat verstärkt ist. C-Jun kann durch JNK phosphoryliert und somit aktiviert werden. Die Phosphorylierung konnte, wie in Abbildung 59A zu sehen ist, in der untersuchten Signalkaskade bestätigt werden, was darauf hinweist, dass aktiviertes c-Jun aus der Stimulation mit Pregnenolonsulfat resultierte.

Zusätzlich wurde die Pregnenolonsulfat-stimulierte c-Jun und c-Fos-Genexpression in primär-kultivierten Inseln aus dem murinen Pankreas während einer Kurzzeitkultivierung analysiert. Dafür wurden die Zellen nach Isolation für 24 h Glukosereduziert und für 1 h mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die RNA wurde anschließend isoliert und die Änderung mittels einer qRT-PCR quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 59B dargestellt und zeigt, dass die mRNA-Konzentrationen von c-Fos wie c-Jun nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat in den isolierten Insel-Zellen aus dem murinen Pankreas erhöht war.

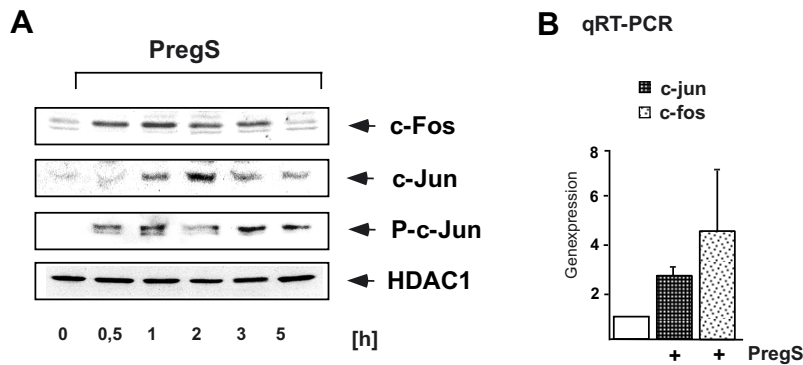


Abbildung 59: Pregnenolonsulfat-Stimulation verstärkt die c-Jun und c-Fos Biosynthese in INS-1 Insulinoma-Zellen und in isolierten Inseln des Pankreas

A: Die Induktion der c-Jun und c-Fos-Biosynthese in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen. Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM) und mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen entweder c-Jun, c-Fos oder die phosphorylierte Form von c-Jun analysiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper. B: Quantitative real-time PCR der RNA von Pregnenolonsulfat-stimulierten (50 μ M, 2 mM Glukose) und unstimulierten isolierten β -Zellen aus dem murinen Pankreas in Kurzzeitkultur. Das c-Jun, bzw. c-Fos Signal wurde auf das 18S rRNA-Signal normalisiert und mit Hilfe der $\Delta\Delta C_Q$ -Auswertung die vielfache Induktion ermittelt.

3.2.8 Eine erhöhte c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen

Zur Bekräftigung der erhaltenen Daten wurde ein c-Jun sowie ein c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen in das Chromatin der INS-1-Zellen integriert. Die jeweiligen Proviren sind als schematische Darstellung in Abbildung 60(A, C) zu sehen. Abbildung 60 zeigt, dass das c-Jun- (B) sowie c-Fos (D)-kontrollierte Reportergene durch die Stimulation mit Pregnenolonsulfat deutlich aktiviert wurde. Der c-Jun-Promotor verfügt über 2 TRE-ähnliche Motive (jun1TRE/ jun2TRE), an die Dimere aus c-Jun und ATF2 binden können (Takahashi et al., 1998). Um die Bedeutung der TRE- Elemente im c-Jun Promotor zu verifizieren, wurde ein mutiertes c-Jun-Promotor/Luziferase-Reportergen verwendet, in dem die beiden TRE-Motive inaktiviert worden waren (Van Dam et al., 1995). Durch den Funktionsverlust der TRE-Elemente wurde der transaktivierende Effekt der Pregnenolonsulfat-Stimulation vollständig gestoppt. Diese Daten zeigen, dass die TRE-Elemente innerhalb des c-Jun-Promotors als Pregnenolonsulfat-sensitive Elemente fungieren.

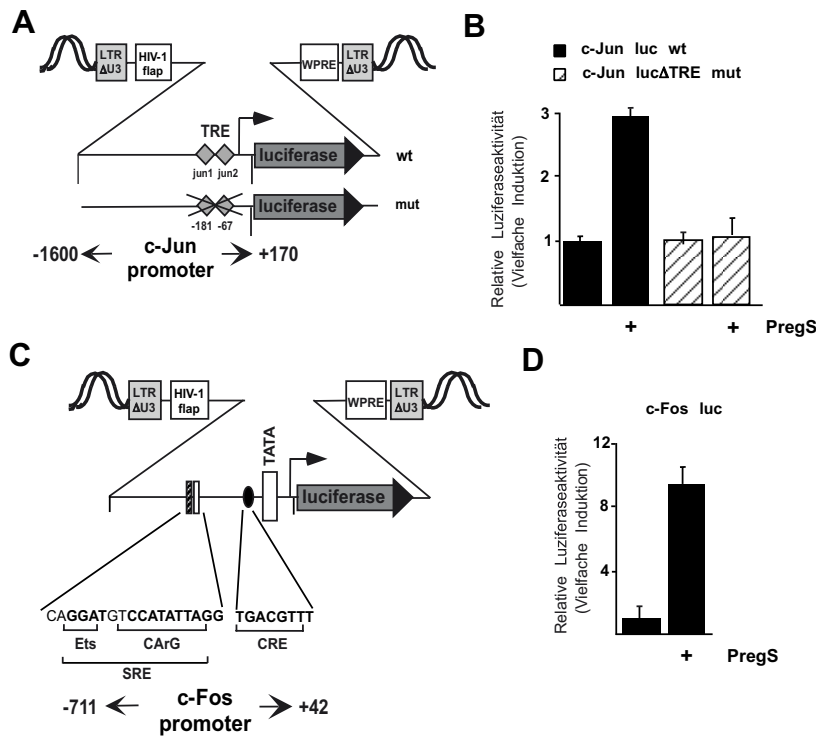


Abbildung 60: Stimulation mit Pregnenolonsulfat verstärkt c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität in Insulinoma-Zellen

A, C: Schematische Darstellung des integrierten Provirus kodierend für ein c-Jun (A) bzw. c-Fos (C)-Promotor/Luziferase-Reporter. Die Promotorelemente wurden upstream des Luziferase-Reportergens eingefügt. Die Lage der zwei TRE-ähnlichen Elemente ist eingezeichnet. Diese sind im c-JunΔTRE-Promotor/Luziferase-Reporter gen mutiert. B, D: INS-1-Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für die c-Jun oder mutierte c-Jun (B) und c-Fos (D)-Promotor/Luziferase-Reportergene kodieren. Die Zellen wurden 24 h in 2 mM Glukose-haltigem Medium Glukosegehungert und anschließend mit Pregnenolonsulfat für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert, die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.9 Das SRE und das CRE dienen als Pregnenolonsulfat-sensitive, genetische Kontrollelemente im menschlichen c-Fos-Promotor

Der c-Fos-Promotor besitzt ein zyklisches AMP Response Element (CRE) und ein Serum Response Element (SRE) wie in Abbildung 60C zu sehen ist. Durch die Expression einer dominant-negativen Mutante von CREB und Elk-1 wurde die Bedeutung von CRE und SRE bei der Pregnenolonsulfat-Wirkung auf das c-Fos-Gen geklärt. Zur Bestimmung der Rolle des SRE bei der Regulation der c-Fos-Promotoraktivität wurde die dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1, REST/Elk-1ΔC, verwendet, welche bereits unter Abschnitt 3.1.1.9 beschrieben wurde (Abbildung 37B, oben). Es wurde kürzlich gezeigt, dass eine Inhibierung der CREB-Aktivität die erhöhte Egr-1-Biosynthese in Glukose und KCl-stimulierten MIN6 Insulinoma-Zellen hemmt (Mayer & Thiel, 2009). Aus diesem Grund wurde die Beteiligung von CREB in der Pregnenolonsulfat-induzierten Signalkaskade, welche zur Aktivierung der SRE- und CRE-vermittelten Transkription führt, durch die Expression einer

dominant-negativen Mutante von CREB, genannt REST/CREB, genauer analysiert (Abbildung 37B, unten). REST/CREB, die Mutante des bZIPs CREB, besitzt die basische Leuzinzipper Domäne von CREB, die bereits erwähnte Repressionsdomäne REST, ein Flag-Tag zum Nachweis der Expression nach erfolgreicher lentiviraler Infektion und ein Kernlokalisierungssignal, jedoch fehlt ihr die Aktivierungsdomäne (Abbildung 37B, unten). Die Expression der Mutante zeigt keinen Einfluss auf die Pregnenolonsulfat-induzierte Egr-1 Biosynthese (Mayer et al., 2011). Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Wirkung von REST/Eik-1 Δ C und REST/CREB bei der Pregnenolonsulfat-induzierten c-Fos-Promotoraktivität analysiert.

In Abbildung 61A und B ist zu sehen, dass die Expression jeder Mutante die Pregnenolonsulfat-verstärkte Reportergentranskription in INS-1-Zellen erniedrigt. Diese Daten zeigen, dass sowohl das SRE als auch das CRE-Element als Pregnenolonsulfat-sensitive Elemente im menschlichen c-Fos-Gen fungieren.

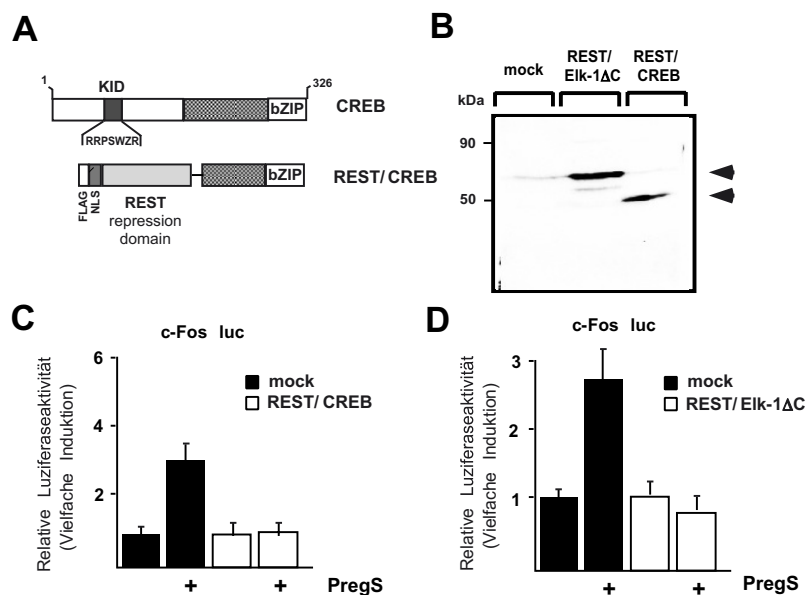


Abbildung 61: Aktivierung von CREB sowie Elk-1 ist bei der Pregnenolonsulfat-gesteigerten CRE/SRE-Transaktivierung im c-Fos Gen in INS-1-Zellen involviert

A: Schematische Darstellung von CREB sowie dessen dominant-negative Mutante REST/CREB. Der REST/Eik-1 Δ C-Mutante fehlt die Phosphorylierung-regulierte Aktivierungsdomäne (KID-Domäne), aber verfügt über die DNA-Bindedomäne sowie die Dimerisierungsdomäne. Die Phosphorylierung – abhängige Aktivierungsdomäne von CREB (Kinase-induzierbare Domäne; KID) sowie die C-terminale bZIP-Domäne ist eingezeichnet. Die Mutanten wurden als Fusionsproteine mit der transkriptionellen Repressionsdomäne REST, einem Flag-Tag zum Nachweis der Expression und einem Kernlokalisierungssignal hergestellt. B: Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche entweder mit Mock oder mit einem rekombinanten Lentivirus-kodierend REST/Eik-1 Δ C oder REST/CREB-, infiziert wurden. Mittels des FLAG-spezifischen Antikörpers wurden im Western Blot die beiden Mutanten detektiert. C, D: INS-1-Zellen wurden mit einem Lentivirus, der für das c-Fos-Promotor-kontrollierte Luciferasegen kodiert, und mit einem Lentivirus, der entweder für REST/Eik-1 Δ C oder REST/CREB kodiert, doppelt-infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Viren infiziert, die für das Kontrollplasmid kodieren. Die Zellen wurden nach Glukosereduktion (2 mM, 24 h) mit Pregnenolonsulfat für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und deren Luciferase-Aktivität gemessen.

3.2.10 Phosphorylierung von CREB und Stimulation der CRE-regulierten Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen

Das bZIP-Protein CREB wird in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen phosphoryliert (Mayer & Thiel, 2009). Aufgrund der ähnlichen Signalweiterleitung von Glukose und Pregnenolonsulfat zur Gentranskription wurde getestet, ob CREB durch die Stimulation mit Pregnenolonsulfat phosphoryliert wird. In Abbildung 62A ist die Phosphorylierung bestätigt. Jedoch ist die Phosphorylierung von CREB keine verbindliche Vorhersage zur tatsächlich folgenden Zielgenaktivierung (Zhang et al., 2005). Zur Messung der tatsächlichen CREB-vermittelten Gentranskription wurde deshalb ein Reporter-gen als Modell der CRE-vermittelten Transaktivierung ins Chromatin der Zellen integriert. Dessen Transkriptionseinheit verfügt ausschließlich über vier Kopien des CRE-Elements als regulatorische Elemente aus dem c-Fos-Gen (Abbildung 62B). Die Transkription dieses CRE-kontrollierten Reporter-gens konnte durch die Stimulation mit Pregnenolonsulfat in den INS-1-Zellen stark aktiviert werden, wie Abbildung 62C zeigt.

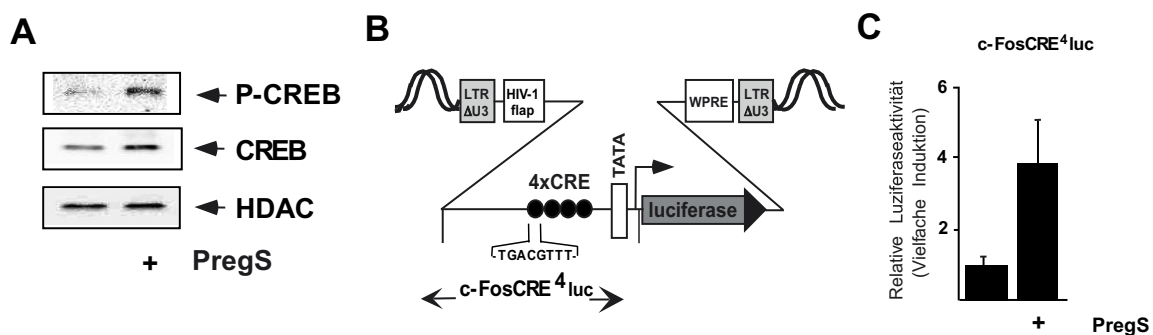


Abbildung 62: Phosphorylierung von CREB und Stimulation der CRE-regulierten Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen

A: Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert und anschließend mit Pregnenolonsulfat für 1 h stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und mittels einer Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen entweder CREB oder die phosphorylierte Form von CREB analysiert. Ein HDAC1-Antikörper diente dabei zur Ladungskontrolle. B: Schematische Darstellung des integrierten Provirus kodierend für ein c-FosCRE⁴-Promotor/Luziferase-Reporter-gen. Die regulatorische Region des Reporter-gens enthält einen Minimal-Promotor, der aus der menschlichen *immunodeficiency virus* TATA Box, dem *adenovirus major late promotor initiator element* und vier Kopien des CRE aus dem c-Fos-Promotor besteht. C: INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für die ein c-FosCRE⁴-Promotor/Luziferase-Reporter-gen kodieren, infiziert. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert und anschließend mit Pregnenolonsulfat für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.11 TRPM3 ist zur Erhöhung der Pregnenolonsulfat-vermittelten c-Jun- und c-Fos Expression sowie der CRE-regulierten Reporter-genaktivität notwendig

Bei der Untersuchung der Pregnenolonsulfat-induzierten Signalkaskade konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der TRPM3-Kanäle in INS-1-Zellen in 2 mM Glukose-haltigem

Medium zur Expression von Egr-1 benötigt wird. Wurden die Zellen jedoch in 11 mM Glukose kultiviert, spielten TRPM3-Kanäle keine Rolle bei der Signaltransduktion (3.2.3). Die Bedeutung der TRPM3-Kanäle in 2 mM Glukose-kultivierten INS-1-Zellen bei der bZIP-vermittelten Genregulation und deren Regulation nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat wurde analysiert. Dafür wurde die TRPM3-spezifische shRNA (unter 3.2.3 erläutert) mittels eines lentiviralen Gentransfers in Insulinoma-Zellen exprimiert. Die biochemische Analyse der TRPM3-spezifischen shRNA exprimierenden Zellen, welche mit Pregnenolonsulfat stimuliert wurden, ist in Abbildung 63 zu sehen: Die Transkription des c-Jun-Promotor/Luziferase-Reportergens wurde durch die Expression der shRNA gegen TRPM3 vollständig gehemmt (Abbildung 63A). Zur Bekräftigung dieses Ergebnisses wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, welche eine erniedrigte c-Jun-Expression in TRPM3-spezifischen shRNA-exprimierenden Zellen zeigt (Abbildung 63B). Genauso wurde die Transkription des c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergens und die c-Fos-Genexpression in Pregnenolonsulfat-stimulierten Zellen durch Expression der TRPM3-spezifischen shRNA verringert (Abbildung 63C, D).

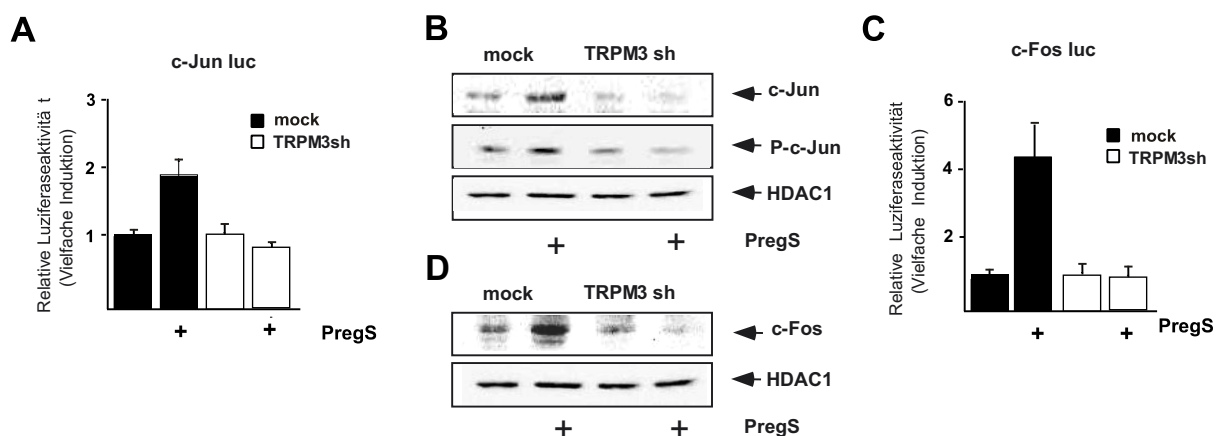


Abbildung 63: Die Pregnenolonsulfat-induzierte c-Jun und c-Fos Biosynthese in Insulinoma-Zellen benötigt TRPM3-Expression

A, C: INS-1-Zellen wurden in Medium mit 2 mM Glukose kultiviert und mit Lentiviren infiziert, die für eine spezifische TRPM3- oder Mock kodieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Virus, der entweder für das c-Jun(A) oder c-Fos(C)-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert, doppeltinfiziert. Zellen wurden für 24 h Glukosereduziert und mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) für 24 h stimuliert. Die Kernextrakte wurden isoliert und die Luziferaseaktivität bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration normalisiert wurde. B, D: INS-1-Zellen wurden in Medium mit 2 mM Glukose kultiviert und mit Lentiviren infiziert, die für eine spezifische TRPM3- oder Mock kodieren. Zellen wurden für 24 h Glukosereduziert und mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) für 1 h stimuliert. Die Kernextrakte wurden isoliert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen c-Fos, c-Jun oder phosphoryliertes c-Jun wie indiziert, analysiert. Als Ladungskontrolle dienten der HDAC1-Antikörper.

Die erhöhte AP-1-vermittelte Gentranskription nach Pregnenolonsulfat-Stimulation wurde durch die Expression der TRPM3-spezifischen shRNA blockiert, wie in Abbildung 64A zu sehen ist. Wurden die Zellen jedoch mit Glukose oder FPL/KCl stimuliert, konnte im Kontrast dazu die Aktivität des AP-1-vermittelten Reportergens nicht durch Hemmung des endogenen

TRPM3 beeinflusst werden (Abbildung 64B, C). Nach Expression der TRPM3-spezifischen shRNA wurde die erhöhte CRE-vermittelte Gentranskription als Folge der Stimulation mit Pregnenolonsulfat ebenfalls blockiert (Abbildung 64D).

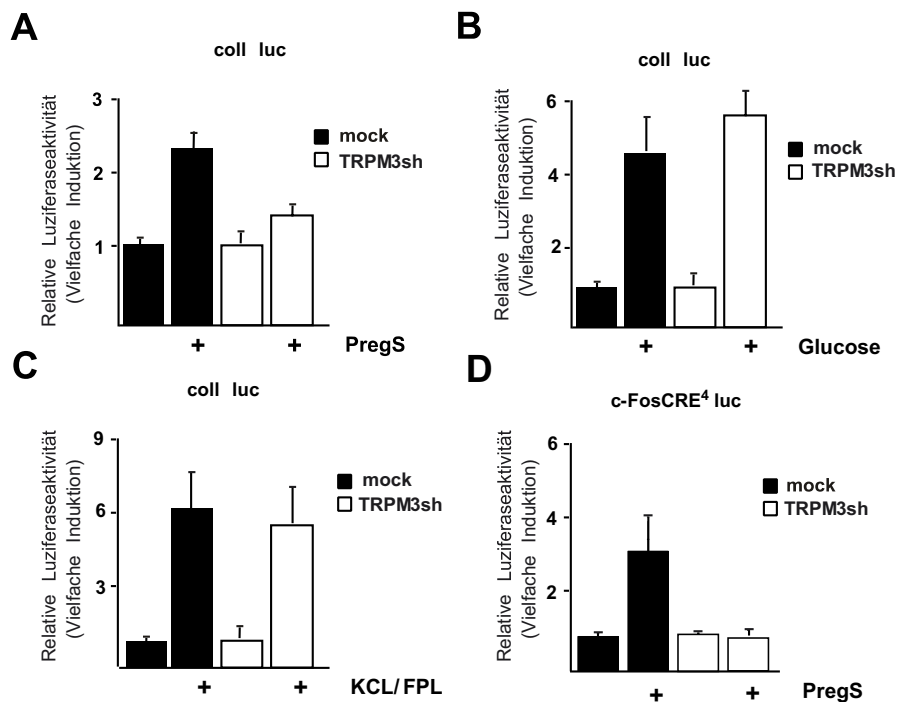


Abbildung 64: Pregnenolonsulfat-induzierte AP-1 und CRE-kontrollierte Transkription in Insulinoma-Zellen benötigt TRPM3-Expression

INS-1-Zellen wurden in Medium mit 2 mM Glukose kultiviert und mit Lentiviren infiziert, die für eine spezifische TRPM3- oder Mock kodieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Virus, der für das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen (A-C) oder ein CRE-kontrolliertes Reportergen (D) kodiert, doppelt infiziert. Zellen wurden für 24 h Glukosereduziert und entweder mit Pregnenolonsulfat (50 μ M) für 24 h (A, D), Glukose (11 mM) für 48 h (B), oder mit KCl (25 mM)/FPL (2,5 μ M) (C) stimuliert. Die Kernextrakte wurden isoliert und die Luziferaseaktivität bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration normalisiert wurde.

Eine Hemmung von TRPM3 mit Hilfe der RNA-Interferenz führte in diesen Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Pregnenolonsulfat-induzierten Verstärkung der AP-1-Aktivität, der CRE-vermittelten sowie der c-Fos und c-Jun-Promoter-Aktivierung. Dies verdeutlicht, dass TRPM3-Kanäle für den benötigten Ca^{2+} -Einstrom zur Signalweiterleitung verantwortlich sind. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die erhöhte c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität, die verstärkte AP-1 und CRE-regulierte Transaktivität sowie die c-Jun und c-Fos-Expression in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen ebenso wie die Egr-1-Biosynthese die Aktivität des TRPM3-Kanals benötigt.

3.2.12 Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen

Der Glukose-Signalweg in Insulinoma-Zellen involviert die Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. In der Literatur wurde beschrieben, dass Pregnenolonsulfat in Neuronen spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle aktiviert (Chen & Sokabe, 2005), (Hige et al., 2006), (Chen et al., 2010). Wie in Abschnitt 3.2.4 bereits gezeigt wurde, führt die Stimulation mit Pregnenolonsulfat zur verstärkten Egr-1 Biosynthese via spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in 2 mM Glukose-kultivierten INS-1-Zellen.

Es wurde ein pharmakologischer Ansatz gewählt, um die Beteiligung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen bei der AP-1-, c-Jun- und c-Fos-Promotor/Reportergentranskription zu klären. Eine Inkubation der Pregnenolonsulfat-stimulierten Zellen mit Verapamil, einem spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal-Blocker, hemmte die c-Jun-, c-Fos-Promotor sowie die AP-1-vermittelte Reportergentranskription (Abbildung 65A-C). In Abbildung 65D ist gezeigt, dass die durch Pregnenolonsulfat-erhöhte Transkription des CRE-kontrollierten Reportergens ebenso durch die Preinkubation mit Verapamil vollständig inhibiert wurde. Zur Kontrolle wurde das Kollagenase-Reportergen verwendet. Wie zu erwarten war, hemmte Verapamil die durch KCl/FPL-stimulierte Transkription des Kollagenase-Gens (Abbildung 65E): Die Membran-depolarisierende Wirkung von KCl/FPL wird via L-Typ Ca^{2+} -Kanäle weitergeleitet (Kunze & Rampe, 1992). Eine Vorbehandlung der Pregnenolonsulfat-stimulierten Zellen mit dem spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal-Blocker Verapamil inhibierte vollständig die Biosynthese von c-Jun und c-Fos (Abbildung 65F).

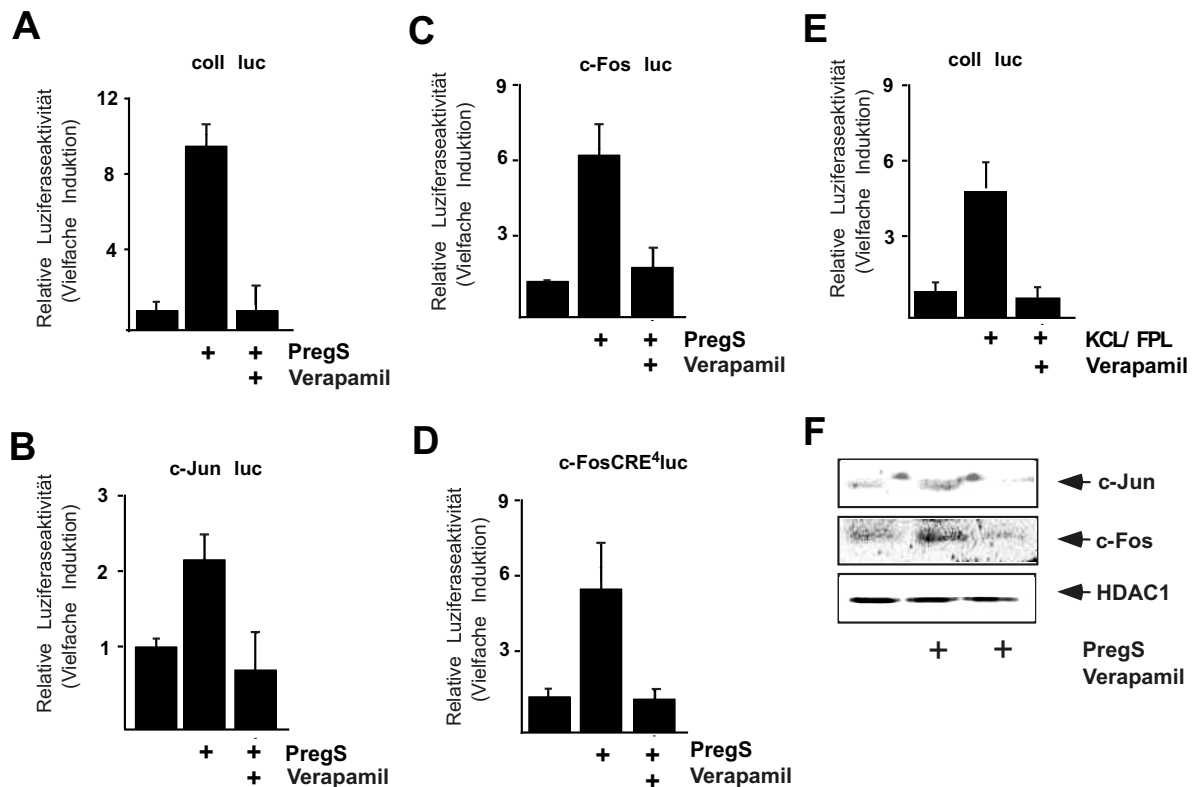


Abbildung 65: Pharmakologische Inhibierung der spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle blockiert die Pregnenolonsulfat-induzierte c-Jun und c-Fos Expression sowie die CRE-regulierte Transkription in INS-1-Zellen

A-E: INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Luziferasegen unter Kontrolle des Kollagenase-Promotors (A), des c-Jun-Promotors (B), des c-Fos-Promotors (C) oder des CRE-kontrollierten Promotors (D) kodieren. Die Zellen wurden 24 h Glukosegehungert und anschließend mit Pregnenolonsulfat, in An- oder Abwesenheit von Verapamil, für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. E: INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Luziferasegen unter Kontrolle des Kollagenase-Promotors kodieren. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert und anschließend mit KCl/FPL (25 mM; 2,5 µM), in An- oder Abwesenheit von Verapamil, für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. F: Zellen wurden für 24 h bei 2 mM Glukose Serum-reduziert und für 1 h mit Pregnenolonsulfat, in Ab- oder Anwesenheit von Verapamil stimuliert. Kernextrakte isoliert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen c-Fos oder c-Jun analysiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper.

Diese Daten zeigen zusammengefasst, dass spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle des L-Typs zur Pregnenolonsulfat-gesteigerten Transaktivierung der Reportergene notwendig sind, welche durch den Kollagenase-Promotor, den c-Jun-Promotor, den c-Fos-Promotor oder mehrfache CRE-Elemente in niedrig-Glukose kultivierten INS-1 reguliert werden. Von daher sind sowohl spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle sowie TRPM3 zur Vermittlung der Pregnenolonsulfat-Kaskade der resultierenden Transkriptionsänderung erforderlich.

Zusätzliche *knockdown*-Experimente wurden durchgeführt, um die wichtige Rolle der L-Typ Ca²⁺-Kanäle in INS-1-Zellen bei der Pregnenolonsulfat vermittelten Genregulation zu

bekräftigen. Dazu wurde eine $Ca_v1.2$ shRNA in den Zellen exprimiert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Die inhibitorische Wirkung der Expression der $Ca_v1.2$ spezifischen shRNA auf die endogene $Ca_v1.2$ -Expression ist in Abbildung 66 gezeigt.

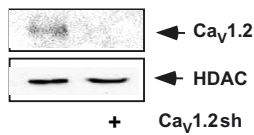


Abbildung 66: Nachweis der $Ca_v1.2$ shRNA-Expression nach erfolgreicher lentiviraler Infektion der INS-1-Zellen

Western Blot-Analyse der INS-1-Zellen, welche mit einem rekombinanten Lentivirus, der für die spezifische shRNA gegen $Ca_v1.2$ kodiert, infiziert wurden. Mit Hilfe eines $Ca_v1.2$ -spezifischen Antikörpers wurde im Western Blot die erniedrigte, endogene $Ca_v1.2$ -Expression nach *knockdown* detektiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper.

Die funktionale Untersuchung ergab, dass der *knockdown* der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle mittels shRNA-Expression die AP-1-vermittelte sowie die c-Fos und c-Jun Genexpression als Folge der Stimulation mit Pregnenolonsulfat deutlich inhibierte (Abbildung 67A-C). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Glukose stimuliert und ebenso die L-Typ Ca^{2+} -Kanal-Expression durch Expression der $Ca_v1.2$ spezifischen shRNA geblockt. Wie in Abbildung 67D zu sehen ist, wurde die AP-1-vermittelte Genaktivierung in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen signifikant vermindert. Diese Ergebnisse konnten die besondere Bedeutung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen und der damit einhergehenden AP-1-regulierten, c-Fos- sowie c-Jun-Genexpression erneut bekräftigen.

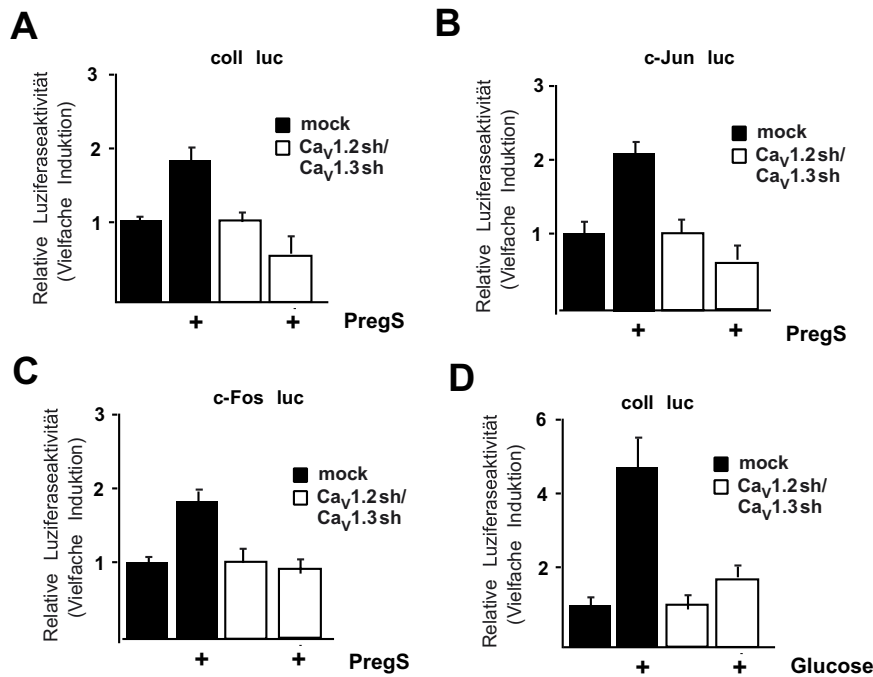


Abbildung 67: Hemmung der Expression der spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle blockiert die Pregnenolonsulfat-induzierte c-Jun und c-Fos Expression sowie die AP-1-regulierte Transkription in INS-1-Zellen

INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Luziferasegen unter Kontrolle des Kollagenase-Promotor (A, D), des c-Jun-Promotor (B) oder des c-Fos-Promotor (C) kodieren. Zusätzlich wurden die INS-1-Zellen mit einem Lentivirus, der entweder für die Kontrolle oder für die Ca_v1.2-spezifische shRNA kodiert, doppelt infiziert. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert und anschließend mit Pregnenolonsulfat (A-C) für 48 h oder mit Glukose (D) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.13 Bedeutende Rolle von extrazellulären und intrazellulären Ca²⁺-Ionen in Pregnenolonsulfat-induzierter Erhöhung der CRE-kontrollierten Transkription in INS-1-Zellen

Aus den vorangehenden Experimenten wurde deutlich, dass TRPM3 und L-Typ Ca²⁺-Kanäle bei der Signaltransduktion von Pregnenolonsulfat quer über die Plasmamembran beteiligt sind. Dies deutet auf einen Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Pregnenolonsulfat induziert in Anwesenheit von extrazellulären Ca²⁺-Ionen starke Ca²⁺-Signale in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen (Charalampopoulos et al., 2008). Infolgedessen wurde im Weiteren die Beteiligung von extra- und intrazellulärem Ca²⁺ bei der Expression des CRE-regulierten Luziferasegens in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen in 2 mM Glukose-haltigem Medium geklärt. EGTA, ein Ca²⁺-Ionen-Chelator wurde zur Pufferung der Ca²⁺ Ionen im Medium verwendet. Abbildung 68A zeigt, dass die Pregnenolonsulfat-verstärkte CRE-vermittelte Transaktivierung unter diesen Bedingungen vollständig blockiert wurde. Diese Daten zeigen, dass ein Einstrom von Ca²⁺-Ionen in INS-1-

Zellen ein wesentlicher Bestandteil der Kaskade darstellt, welche die Pregnenolonsulfat-Stimulation mit der gesteigerten CRE-Transaktivierung ermöglicht. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass, wenn die Pregnenolonsulfat-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ durch eine Vorinkubation mit BAPTA-AM, einem membrangängigen Calciumchelator, ausgeschlossen wurde, die induzierte Expression des CRE-kontrollierten Reportergens völlig inhibiert wurde (Abbildung 68B). Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle sowie TRPM3 und der nachfolgenden erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ zur Induktion der CRE-vermittelten Transkriptionsaktivität infolge einer Stimulation mit Pregnenolonsulfat in INS-1-Zellen unbedingt notwendig ist.

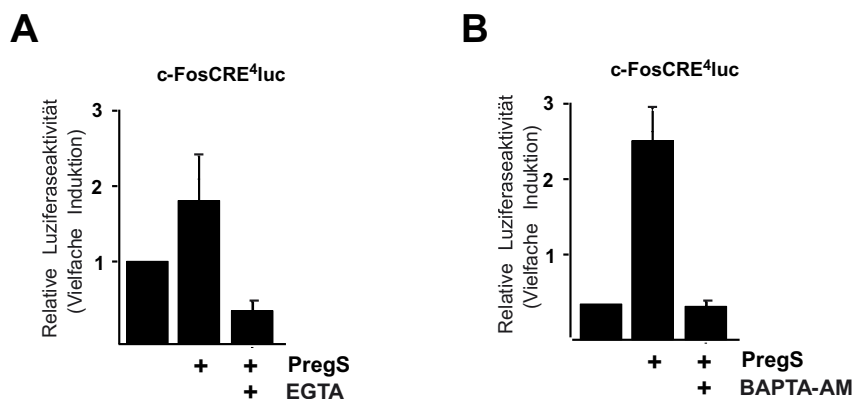


Abbildung 68: Chelatierung des extra- und intrazellulären Ca^{2+} vermindert die CRE-kontrollierte Transkription in Pregnenolonsulfat stimulierten INS-1-Zellen

INS-1-Zellen wurden in 2 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die für das Luziferasegen unter Kontrolle des CRE-kontrollierten Promotors kodieren. Die Zellen wurden 24 h Glukose-reduziert (2 mM) und anschließend mit Pregnenolonsulfat, in An- oder Abwesenheit von EGTA (500 μ M) (A) oder BAPTA-AM (25 μ M) (B) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.14 Aktivierung von ERK ist unerlässlich für die Induktion der bZIP-vermittelten Biosynthese in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen

Eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration löst oft eine Aktivierung von ERK aus. Diese erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stellt u. a. einen entscheidenden Faktor für die Induktion der Egr-1-Biosynthese in vielen Zelltypen, einschließlich den Insulinoma-Zellen, dar (Thiel et al., 2010). Von diesem Sachverhalt ausgehend, wurde die Rolle von ERK in Pregnenolonsulfat-behandelten INS-1-Zellen mit genetischen und pharmakologischen Tools genauer untersucht. Dafür wurde Raf, eine MAP Kinase-Kinase-Kinase, gehemmt. Dies wurde mittels Expression eines dominant-negativen-Antagonisten des Ras/ERK Signalweges erreicht. Zweitens wurden INS-1-Zellen mit PD98059 behandelt. Dabei handelt es sich um eine Substanz, die Phosphorylierung der MAP Kinase Kinase durch Raf hemmt. Abbildung 26A zeigt den modularen Aufbau von DA-Raf1. Die funktionale Auswirkung der

DA-Raf1-Expression wurde untersucht (Abbildung 69). Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Expression der DA-Raf1 Mutante in INS-1-Zellen die Pregnenolonsulfat-erhöhte CRE-kontrollierte Reporterexpression deutlich reduziert wurde. Diesen Daten zufolge ist die ERK1/2-Aktivierung ein wichtiges Ereignis bei der Regulation der CRE-kontrollierten Genexpression in Folge der Pregnenolonsulfat-induzierten Signalkaskade in INS-1-Zellen .

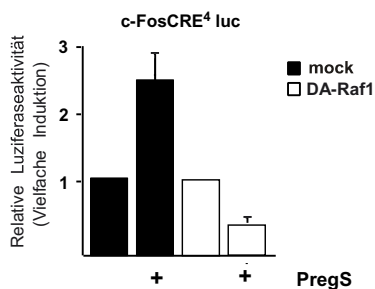


Abbildung 69: Essentielle Rolle von Raf und ERK für die Regulierung der CRE-vermittelten Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1 β -Zellen des Pankreas.

INS-1 Insulinoma-Zellen wurden mit Lentiviren, welche für ein CRE-reguliertes Promotor/Luziferase-Reporter gen sowie für DA-Raf1 kodieren, doppelt-infiziert. Als Kontrolle wurden INS-1-Zellen mit lentiviralem Kontrollvektor (pFUW) kodierenden Viren präpariert. Die Zellen wurden für 24 h Glukose-reduziert (2 mM Glukose) und anschließend mit Pregnenolonsulfat für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

3.2.15 Erhöhte Expression des Pdx-1-Gens in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen

Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation mit Pregnenolonsulfat zu biologisch-aktivem Egr-1 führt. Egr-1 bindet unter physiologischen Bedingungen in Stimulus-abhängiger Weise an Egr-1 Zielgene, wie z. B. das *pancreatic duodenum homeobox-1* (Pdx-1) Gen, dem Hauptregulator der Insulin-Genexpression, (Eto et al., 2007), (Mayer et al., 2011). Zudem erhöht eine Glukose-Stimulation die Insulin-Promotoraktivität in INS-1 Insulinoma-Zellen (Abbildung 21). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit Pregnenolonsulfat eine erhöhte Insulin-Promotor-Aktivität sowie Insulin-mRNA detektiert werden kann (Mayer et al., 2011). Aufgrund der Ähnlichkeit der Pregnenolonsulfat und Glukose-induzierten Signalkaskaden war die Frage, ob Pdx-1 auch durch Glukose-Stimulation verstärkt transkribiert wird. In Abbildung 70 ist zu sehen, dass eine Stimulation mit Glukose die Biosynthese von Pdx-1 induziert.

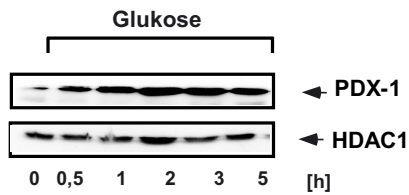


Abbildung 70: Glukose verstärkt die Pdx-1 Biosynthese in INS-1 Insulinoma-Zellen

A: Die Induktion der Pdx-1 Biosynthese in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen. Zellen wurden für 24 h bei 2 mM Glukosereduziert und mit Glukose (11 mM), wie angegeben, stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen Pdx-1 gerichtet ist, analysiert. Als Ladungskontrolle diente der HDAC1-Antikörper.

3.3 Regulation der Insulinbiosynthese, des Blutglukosespiegels und der Proliferation in β -Zellen des Pankreas durch Egr-Transkriptionsfaktoren

3.3.1 Bedeutende Rolle des Transkriptionsfaktors Egr *in vivo*

Glukose induziert via Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Egr-Expression in β -Zellen (Mayer & Thiel, 2009). Darüberhinaus fördert Glukose die Bindung von Pdx-1, dem Hauptkontroll-Element der Insulintranskription, an die A3-Box des Insulinpromoters (Melloul et al., 1993). Egr-1 bindet seinerseits an die Egr-Bindestelle im Pdx-1-Promotor (Mayer et al., 2011), (Eto et al., 2007). Weitere Experimente auf der Basis transgener Mausmodelle sollten nun die Hypothese bestätigen, dass Egr-1 eine Auswirkung auf die Biosynthese von Insulin und weiteren β -Zellfunktionen *in vivo* hat.

3.3.1.1 Egr-1/Zn-doppel-transgene Mäuse

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 konnte zusammen mit 2 weiteren Proteinen der Egr-Familie (Egr-2, Egr-3) in den INS-1 Zellen sowie in Insel des Pankreas mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 71).

Egr-Proteine besitzen stark homologe DNA-Bindedomänen, mit denen sie an GC-reiche Zielsequenzen binden. Es stellte sich heraus, dass eine funktionelle Redundanz zwischen Egr-Proteinen existiert. (Mayer et al., 2009),

Zur Vermeidung des Problems der funktionalen Redundanz zwischen den verschiedenen Egr-1 Proteinen (Costello et al., 2010) wurde die Entscheidung getroffen, eine dominant-negative Mutante von Egr-1, Egr-1/Zn, in den β -Zellen des murinen Pankreas zu exprimieren (Abbildung 71B). Diese Mutante verfügt zwar über die notwendige DNA-Bindedomäne, jedoch fehlt ihr die N-terminale Aktivierungsdomäne von Egr-1 sowie die Bindestellen für die transkriptionellen Co-Repressoren NAB1 und NAB2. Aufgrund der Tatsache, dass die Egr-

Proteine alle an die gleiche G/C-reiche DNA-Bindedomäne der Zielgenpromotoren binden, war durch Verwendung der Egr-Mutante sichergestellt, dass dieses Egr-1/Zn-Protein mit der biologischen Aktivität aller Egr-Proteine interagiert (Abbildung 71C).

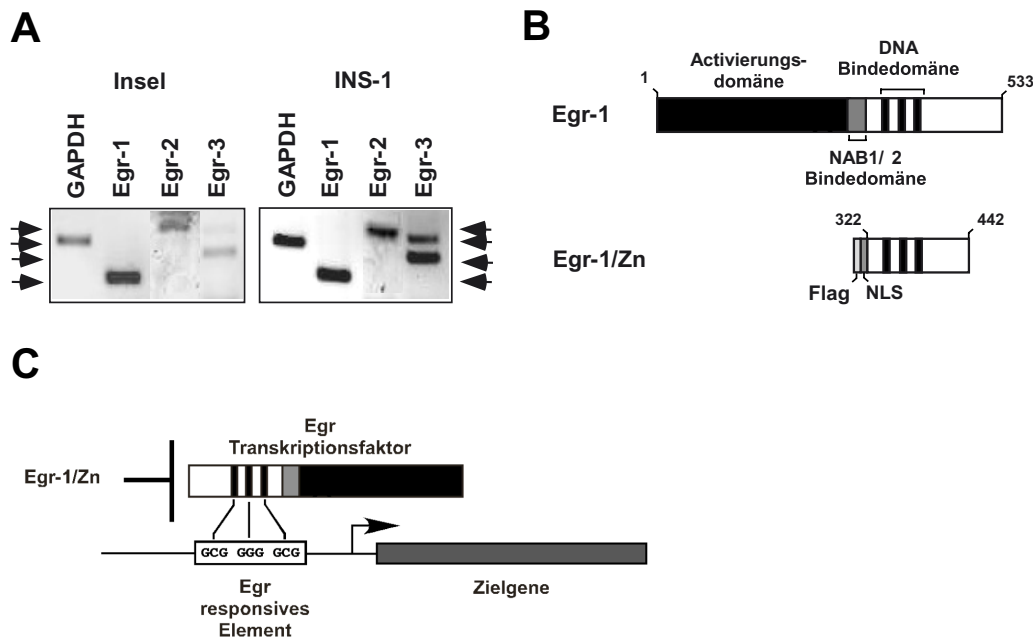


Abbildung 71: Modell zur Funktionsweise der Transkriptionsfaktormutanten Egr-1/Zn

A: Expression von Egr-1, Egr-2 und Egr-3-mRNA in β -Zellen und INS-1-Zellen. Inseln des Pankreas wurden isoliert, die mRNA extrahiert und in einer RT-PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. B: Schematische Darstellung der modularen Struktur vom Egr-1 Wildtyp und deren Mutante Egr-1/Zn. Die N-terminale Aktivierungsdomäne und die Zinkfinger DNA-Bindedomäne sind eingezeichnet. Die Egr-1/Zn-Mutante besitzt die zur DNA-Bindung befähigte Zinkfinger-Domäne, jedoch fehlt ihr die Aktivierungsdomäne sowie die NAB1/NAB2-Bindedomäne. Zusätzlich verfügt Egr-1/Zn über einen Flag-Tag zum immunologischen Nachweis der Expression und ein Kernlokalisierungssignal am N-Terminus. C: Die Mutanten Egr-1/Zn binden an die DNA von Egr-1-responsiven Genen und blockieren diese Bindungsstellen, so dass Wildtyp-Proteine diese Gene nicht mehr transaktivieren können.

Es wurde ein induzierbares Expressionssystem verwendet, um mögliche Entwicklungsdefekte der Transgenexpression auf die Entwicklung des Pankreas zu vermeiden. Wie in Abbildung 72A dargestellt ist, wurden der isolierte und aufgereinigte Abschnitt des pBIG-Egr-1/Zn-Vektors zur Generierung der transgenen Mäuse verwendet. Die damit generierte Mauslinie, genannt [tetO]7Egr-1/Zn, kodiert einerseits für die Egr-1-Mutante und für die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des bi-direktionalen, Tetracyclin-Operator-basierten Promotors (tetO). Dies ermöglicht es, die gewebsspezifische Expression der Egr-Mutante nach Induktion histochemisch zu detektieren. Diese Mauslinie wurde mit RIP-rtTA-Mäusen gekreuzt, die den reversen Tetracyclin-Aktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Ratten-InsulinII-Promotors (RIP) exprimieren (Abbildung 72B). Die Zugabe des Tetracyclin-Analogons Doxyzyklin ermöglichte es dem rtTA an die *tet operator*-Sequenz zu

binden und folglich die Transkription von Egr-1/Zn sowie β -Galaktosidase-Zielgene in diesem „Tet-On System“ zu aktivieren.

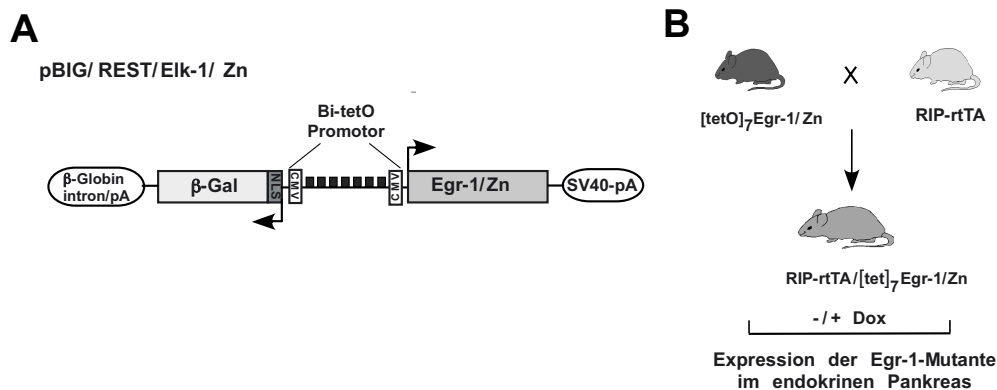


Abbildung 72: Design und Generierung der doppeltransgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse

A: Zur Transgenese verwendeter, gereinigter Abschnitt des Vektors BIG-Egr-1/Zn, dessen bi-direktionaler tetO-Promotor die Expression von Egr-1/Zn sowie β -Galaktosidase in Anwesenheit des reversen Transaktivators rtTA ermöglicht. B: Schematische Darstellung der Generierung der induzierbaren doppel-transgenen Mäuse durch Kreuzung der [tetO]₇Egr-1/Zn Mäuse mit den RIP-rtTA Mäusen.

3.3.1.2 Doxyzyklin-abhängige Expression der dominant-negativen Mutante von Egr-1, Egr-1/Zn, sowie der β -Galaktosidase in den β -Zellen des Pankreas

Zur Erzeugung der doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse wurden zwei unabhängige [tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse verwendet. Durch einen Vergleich der Transgenexpression wurde die Linie mit der stärkeren Transgen-Expression für die weiteren Untersuchungen verwendet. Doppel-transgene RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse wurden in Ab- oder Anwesenheit von Doxyzyklin gehalten, die Inseln isoliert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Abbildung 73A zeigt, dass die Egr-1/Zn-Mutante nur in Inseln von Mäusen exprimiert wird, denen der Zusatz von Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht wurde. In den Doxyzyklin-unbehandelten Mäusen konnte keine Expression des Transgens detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte mittels RT-PCR der isolierten mRNA aus doppel-transgenen Mäusen bestätigt werden (Abbildung 73B). Immunhistochemische Untersuchungen von Kryoschnitten des gesamten Pankreas doppel-transgener Mäuse ergaben, dass die β -Galaktosidase nur spezifisch in Inseln und nicht im exokrinen Pankreas der Mäuse exprimiert wurde, welche Doxyzyklin im Trinkwasser erhielten (Abbildung 73C). Dies konnte durch die X-Gal-Färbung von Kryoschnitten einzeln isolierter Inseln bestätigt werden (Abbildung 73D). Als Negativkontrolle diente die entnommene Milz doppel-transgener Mäuse, welche mit und ohne Doxyzyklin kultiviert wurden. Es konnte keine β -Galaktosidase-Expression nach X-Gal-Färbung detektiert werden (Abbildung 73E).

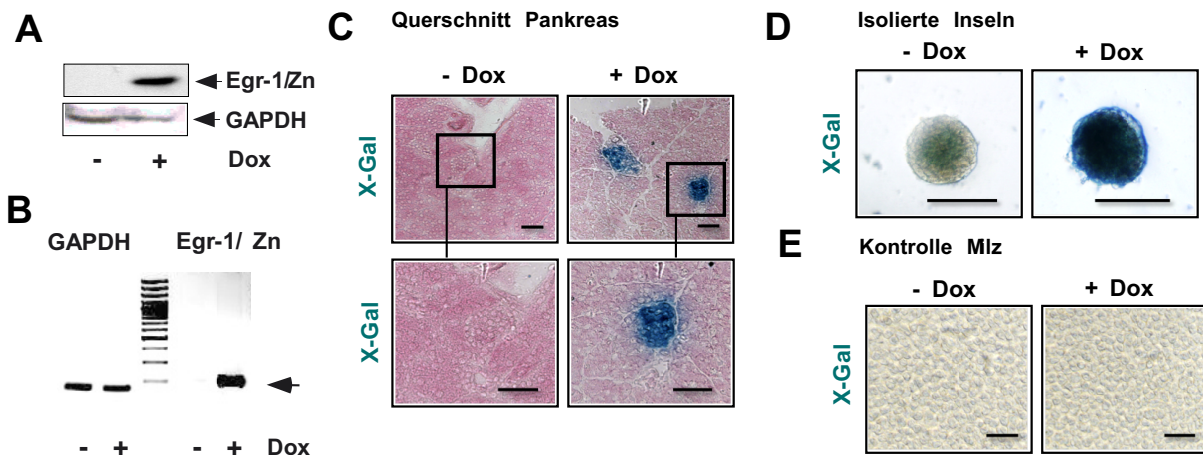


Abbildung 73: Expression von Egr-1/Zn und β -Galaktosidase in doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen

Nachweis der Transgen-Expression A: Western Blot-Analyse von Inseln aus doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen, welche in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin im Trinkwasser gehalten wurden. Gesamtzellextrakte wurden präpariert und im Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen das FLAG-Tag detektiert. Als Kontrolle wurde die Expression von GAPDH bestimmt. B: RT-PCR der isolierten mRNA von doppel-transgenen Mäusen, welche mit und ohne Doxyzyclin gehalten wurden. Als Kontrolle wurde die mRNA von GAPDH detektiert. C: Histochemische, X-Gal gefärbte Kryoschnitte des Pankreas (C), von isolierten, gepickten Inseln in Kurzzeitkultur (D) oder der Milz (E) aus doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen, welche in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin (Dox) im Trinkwasser gehalten wurden: Die mittels X-Gal Färbung identifizierbare β -Galaktosidase ist anhand blauer Färbung sichtbar.

3.3.1.3 Verminderte Pdx-1-, Insulin-, VEGF-A- und GLUT2-mRNA Menge in Egr-1/Zn exprimierenden β -Zellen

Egr-1 ist zur Bindung an den Pdx-1-Promotor in Insulinoma-Zellen *in vitro* befähigt (Eto et al., 2007), (Mayer et al., 2011). Vor dem Hintergrund, dass Pdx-1 an der direkten Regulation der Insulin-Genexpression beteiligt ist, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Egr-1-Expression die Insulin-mRNA in murinen Inseln vermehrt und die Insulin-Promotoraktivität in Insulinoma-Zellen stimuliert (Mayer et al., 2011).

Auf diesem Vorwissen basierend, wurde getestet, ob die Expression der Egr-1-Mutante eine Änderung der Pdx-1- sowie der Insulin-mRNA Synthese in doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen hervorruft. Die Mäuse wurden in An- oder Abwesenheit von Doxyzyclin gehalten, die Inseln isoliert, die mRNA extrahiert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Abbildung 74A zeigt, dass durch Expression der Egr-1-Mutante die Konzentration der Pdx-1-mRNA signifikant erniedrigt ist. Zusätzlich wurde ein Rückgang der Insulin-mRNA in doppel-transgenen Mäusen nach Doxyzyclin-Gabe gemessen (Abbildung 74B). Im Gegensatz dazu wurde in den transgenen [tetO]₇Egr-1/Zn-Kontrolltieren, welche keinen rtTA-Aktivator exprimieren, keine signifikant veränderte Pdx-1- bzw. Insulin-Genexpression in Doxyzyclin-behandelten Mäusen detektiert. Die Glukagon-mRNA von blieb trotz Expression

von Egr-1/Zn unverändert (Abbildung 74C). Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass bei Egr-1/Zn- Expression die Expression von VEGF-A und dem GLUT2 erniedrigt wurde (Abbildung 74D, E).

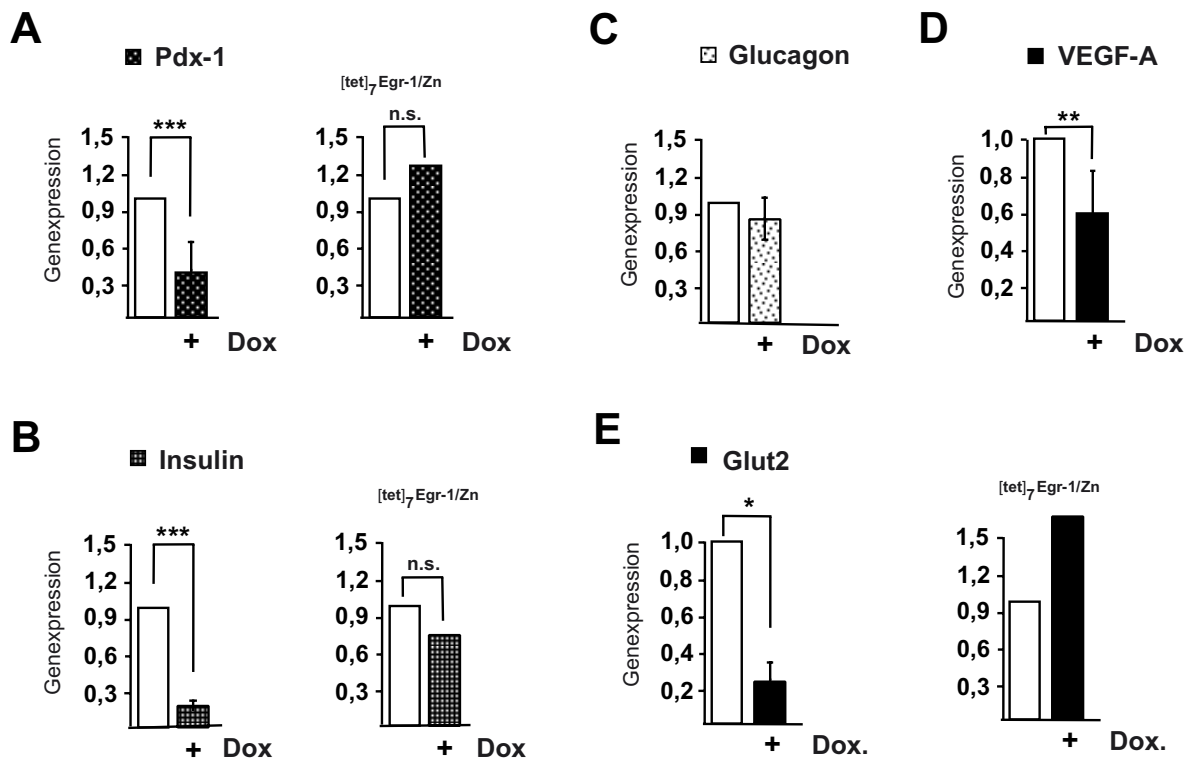


Abbildung 74: Verminderte Pdx-1-, Insulin-, VEGF-A- und GLUT2-mRNA Konzentration in Egr-1/Zn-exprimierenden β -Zellen

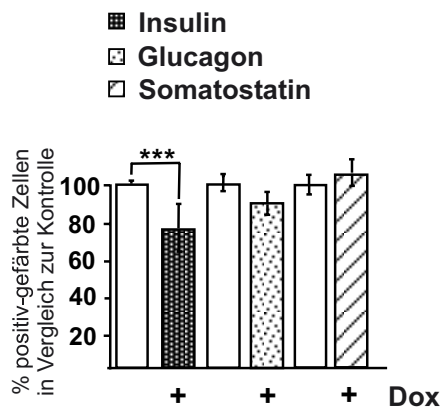
Real-time RT-PCR Quantifizierung von Pdx-1 (A), Insulin (B), Glukagon (C), VEGF-A (D) und GLUT2 (E): RNA wurde aus Inseln präpariert, die von doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen (A, links; B, links; C; D; E, links) oder den einzel-transgenen [tetO]₇Egr-1/Zn-Kontrolltieren (A, rechts; B, rechts; E, rechts) stammten, welche in An- und Abwesenheit von Doxycyclin behandelt wurden. $P_{\text{Pdx-1}} < 0,001$; $P_{\text{Insulin}} < 0,001$; $P_{\text{VEGF-A}} = 0,007$; $P_{\text{GLUT}} = 0,023$.

3.3.1.4 Verminderte Pdx-1 und Insulin-Immunreaktivität in Egr-1/Zn-exprimierenden β -Zellen

Es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, um die auf RNA-Messung basierenden Daten auf Proteinebene zu bestätigen. Dafür wurden einerseits Querschnitte des isolierten Pankreas sowie Paraffinschnitte von Inseln angefertigt, die zuvor mittels Kollagenase-Verdauung einzeln isoliert wurden. Diese Schnitte wurden immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Zur Bestimmung der Tatsache, ob sich die Dauer der Transgen-Expression in den Ergebnissen manifestiert, wurden die Inseln von 15 Wochen sowie 4 Wochen alten Mäusen zur Analyse herangezogen. In Abbildung 75 ist zu sehen, dass zu beiden Zeitpunkten eine signifikant erniedrigte Insulinexpression detektiert wurde.

A 15 Wochen

Inseln im Gewebe

**B 4 Wochen**

Inseln im Gewebe

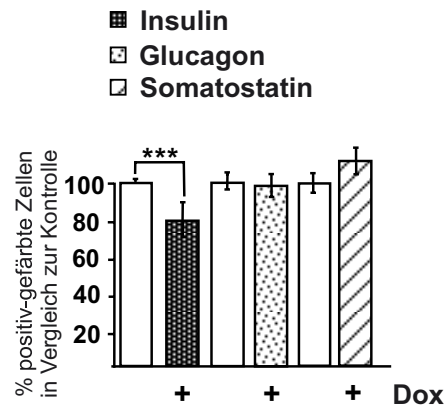


Abbildung 75: Vergleich der immunhistochemischen Detektion der Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-Expression in Inseln von transgenen Mäusen, welche die dominant-negative Mutante von Egr-1 exprimieren

Immunhistochemische Detektion von Insulin, Glukagon- und Somatostatin in β -Zellen des Pankreas von 15 Wochen (A) bzw. 4 Wochen (B) alten, doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen; $P_{\text{Insulin}} < 0,001$.

Die Pdx-1-Expression war in Inseln von Doxyzyklin-behandelten, doppel-transgenen Mäusen signifikant erniedrigt (Abbildung 76A). Ein stellvertretendes Beispiel eines Pdx-1 gefärbten Histologieschnitts der untersuchten Pankreata ist in Abbildung 76B dargestellt. Eine Reduzierung der Insulin-Immunreaktivität in Egr-1/Zn exprimierenden Pankreata konnte das Ergebnis aus der RT-PCR bestätigen, während die Expression von Glukagon und Somatostatin trotz Transgenexpression unverändert blieb (Abbildung 76C). Die immunhistochemisch mit Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-Antikörper inkubierten Schnitte sind in Abbildung 76E stellvertretend gezeigt. Die übliche gleichmäßig-verteilte Insulin-Expression im pankreatischen Gewebe von Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen zeigte größere Lücken im Expressionsmuster der Schnitte (Abbildung 76D).

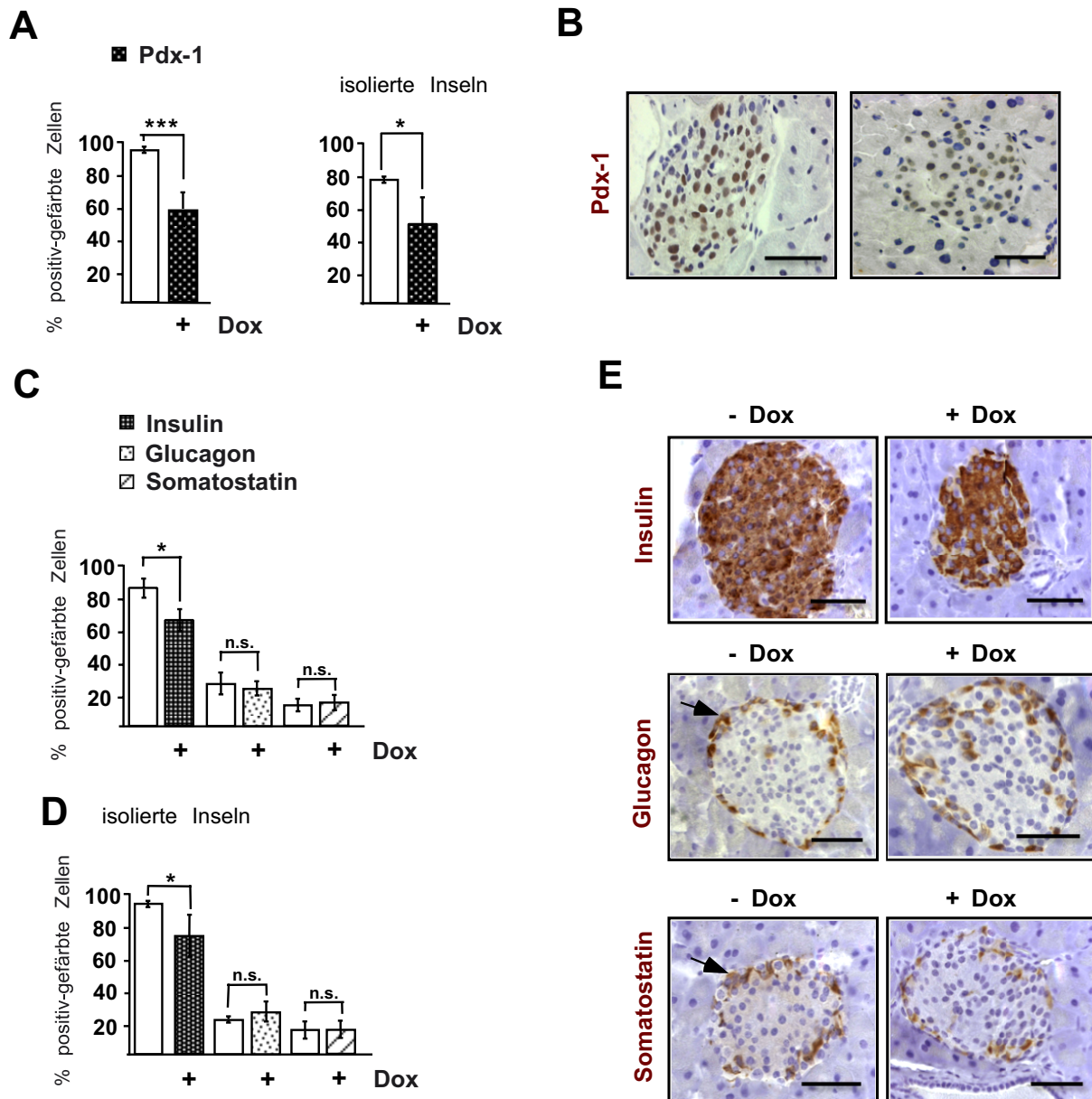


Abbildung 76: Immunzytochemische Analyse der Pdx-1, Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-Expression in Inseln von transgenen Mäusen, welche die dominant-negative Mutante von Egr-1 exprimieren

Immunzytochemische Detektion von Pdx-1 (A), Insulin, Glukagon- und Somatostatin (C, D): Inseln des Pankreas von 15-Wochen alten, doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen. Als Grundlage dienten Schnitte von isolierten Inseln (A, rechts; D) oder Querschnitte des gesamten Pankreas (A, links; C). B, E: Auszug Pdx-1 (B)-, Insulin-, Glukagon- und Somatostatin (E)-gefärbter Histologieschnitte. $P_{\text{Pdx-1}} < 0,001, 0,0179$; $P_{\text{Insulin}} < 0,0152, 0,045$;

3.3.1.5 Verschlechterte Glukosetoleranz und verminderte Insulinfreisetzung der RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse

Aus den Expressionsanalysen wurde deutlich, dass in den doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen eine verminderte Insulin-Biosynthese resultierend aus der Transgen-Induktion festzustellen ist. Deswegen wurden die doppel-transgenen Mäuse auch auf eine veränderte Glukosetoleranz getestet. Um den Effekt der Egr-1 Mutante auf den

Glukose-Metabolismus in den β -Zellen zu bestimmen, wurde mittels intraperitonealer Injektion von Glukose ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Diese Resultate zeigen, dass in Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen im Vergleich zu den Doxyzyklin-unbehandelten, doppel-transgenen Mäusen der Blutglukosespiegel über einen längeren Zeitraum deutlich erhöht ist (Abbildung 77A). Zusätzlich wurden Wildtyp-Mäuse des C57/BL6 (B6)-Stammes bei den Glukosetoleranzversuchen mitgeführt, deren Blutzuckerspiegelverlauf dem der Doxyzyklin-unbehandelten Mäusen entsprach. Die resultierende Kurve wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht im Diagramm eingezeichnet. Als Kontrolle dienten die [tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse, bei denen keine signifikante Blutglukoseänderung nach Verabreichung von Doxyzyklin erkennbar wurde (Abbildung 77B). Die Quantifizierung der Blutglukosekonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten nach Glukoseinjektion – als Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ausgedrückt und in Abbildung 77C, D gelistet – zeigt den signifikant erhöhten Blutzuckerspiegel nach der Blutzuckerherausforderung in den Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen (Abbildung 77). Wie zu sehen ist, bleibt die Glukosekonzentration im Blut über einen längeren Zeitraum erhöht.

Die Insulin-Freisetzung wurde ebenfalls nach Blutzuckerherausforderung durch intraperitoneale Glukose-Injektion gemessen. Abbildung 77E zeigt, dass die erniedrigte Glukosetoleranz der doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse von Defiziten der Insulin-Freisetzung begleitet werden.

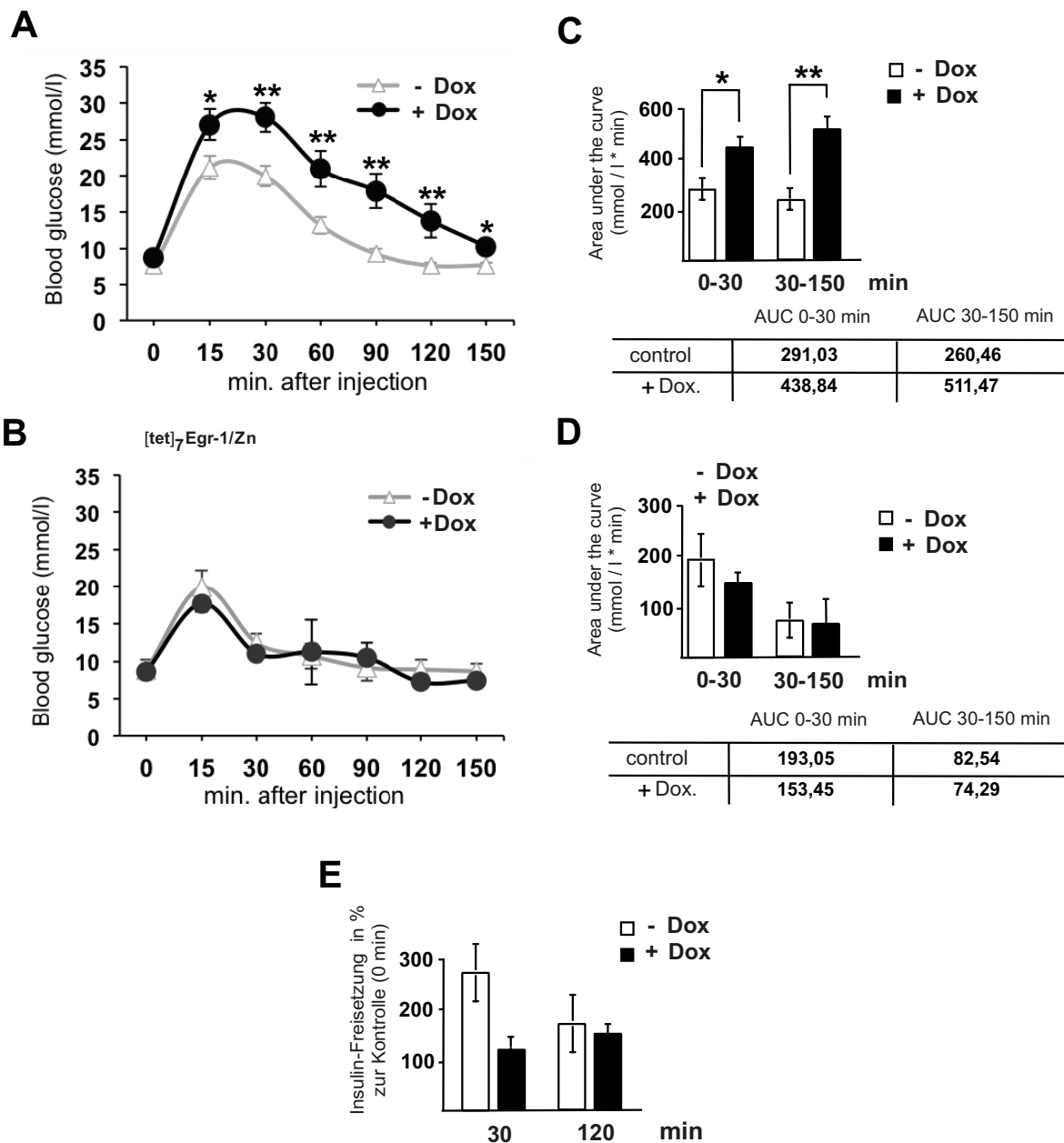


Abbildung 77: Egr-1/Zn-Expression in doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen induziert Hyperglykämie bei Glukose-Injektion

A: Glukosetoleranztest wurde von doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen in Ab- oder Anwesenheit von Doxyzyklin durchgeführt. Den Tieren wurde 2 mg Glukose /g Körpergewicht intraperitoneal injiziert, Blut zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und die Glukosekonzentration ermittelt. B: Glukosetoleranztest wurde von einzel-transgenen [tetO]₇Egr-1/Zn Mäusen in Ab- oder Anwesenheit von Doxyzyklin durchgeführt. Den Tieren wurde 2 mg Glukose /g Körpergewicht intraperitoneal injiziert, Blut zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und die Glukosekonzentration ermittelt. C, D: AUC (*area under the curve*) wurde aus erhaltenen Werten in (A) bzw. (B) berechnet und in tabellarischer Übersicht dargestellt. E: Insulin-Freisetzung wurde von doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen in Ab- oder Anwesenheit von Doxyzyklin durchgeführt. Den Tieren wurde 2 mg Glukose /g Körpergewicht intraperitoneal injiziert, Blut zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und die Serum-Insulinkonzentration via ELISA ermittelt. Fehlerbalken in A, C, E als $-/+$ SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler); Fehlerbalken B, D als $-/+$ SD.

3.3.1.6 Erniedrigte β -Zellproliferation in Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Egr-Transkriptionsfaktoren die Proliferation in Astrozyten reguliert (Mayer et al., 2009). Durch die Expression der Egr-1 dominant-negativen Mutante ist die mögliche Wechselbeziehung von Egr-1 und der Proliferation entkoppelt und wurde anhand proliferativer Assays analysiert. Zur Messung der β -Zellproliferation *in vivo* wurde die Methode des BrdU-Einbaus in die DNA als eine DNA-Synthese Marker verwendet. Doppel-transgene RIP-rtTA[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse in Ab- oder Anwesenheit des Aktivators Doxyzyklin bekamen i. p. eine BrdU-Lösung injiziert. Der erfolgte Einbau des Thymidin-Analogons wurde anhand der BrdU-Immunreaktivität in Paraffinschnitten der untersuchten Pankreata bestimmt. Wie in Abbildung 78A zu sehen ist, konnte eine Reduzierung des BrdU-Einbaus bei den doppel-transgenen Mäusen festgestellt werden, welche die Egr-1/Zn-Mutante exprimieren. Zur Unterstützung dieser Daten wurde die Expression von PCNA, einem weiteren Proliferationsmarker, analysiert. Die Expression von PCNA wurde ebenfalls signifikant erniedrigt, welche auf die Wechselwirkungen der Egr-1-Mutante mit endogenen Egr-Proteinen zurückzuführen ist (Abbildung 78B). Zusätzlich wurde die immunhistochemische Detektion in 4 Wochen und 15 Wochen alten Mäusen verglichen (Abbildung 78B). Die Ergebnisse der immunhistochemischen PCNA-Färbungen bekräftigt die Aussage des BrdU-Assays, dass aufgrund der Expression der Egr-1-Mutante eine verminderte Proliferation in den doppel-transgenen Mäusen stattfindet.

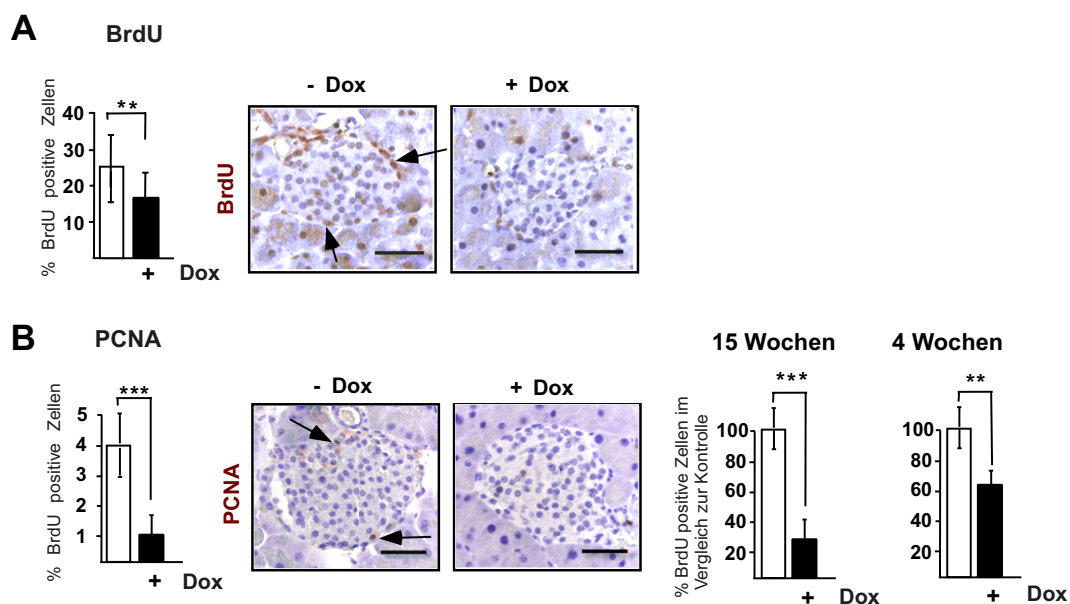


Abbildung 78: Erniedrigte DNA Biosynthese und PCNA-Expression durch Expression der Egr-1/Zn-Mutante

A: 15 Wochen alte, doppel-transgene RIP-rtTA[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse, welche mit oder ohne Doxyzyklin im Trinkwasser gehalten wurden, bekamen i. p. BrdU injiziert. Nach 6 h wurde die Tiere narkotisiert, Pankreata entnommen und in Paraffin eingebettet. Ein BrdU-spezifischer Antikörper wurde zur immunhistochemischen Analyse der Serienschritte verwendet. Der Einbau von BrdU in die

β -Zellen wurde quantifiziert. Repräsentative Färbungen sind abgebildet. B: Analytierte Expression von PCNA in 15 Wochen alten, doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen, die in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin gehalten. Quantifizierung durch Bestimmung der Anzahl positiv gefärbter Zellen aus Gesamtzellzahl der Inseln. Repräsentative Färbungen sind abgebildet. PCNA-Expression von 15 Wochen alten bzw. 4 Wochen alten doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse, welche mit oder ohne Doxyzyklin im Trinkwasser gehalten wurden. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der Anzahl positiv gefärbter Zellen aus Gesamtzellzahl. Die Kontrolle wurde 100% gesetzt.

3.3.1.7 Erniedrigte β -Zellmasse in Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen

Morphometrische Auswertungen wurden durchgeführt, um die Wirkung der Egr-1/Zn-Mutante auf Zellmasse, Zellgröße und Anzahl der Inseln im Pankreas zu analysieren. Dafür wurden 4 und 15 Wochen alte doppel-transgene Mäuse mit und ohne Doxyzyklin gehalten, die Pankreata isoliert und jeder 6. behandelte Paraffinschnitt ausgewertet. Aufgrund des zeitintensiven Auswertens von jedem 6. Schnitt wurde nach Prüfung der Zuverlässigkeit auf die Auswertung jedes 24. Schnittes übergegangen. Wie in Abbildung 79A dargestellt ist, wurde in Egr-1/Zn-exprimierenden Mäusen eine deutlich verringerte Inselgröße festgestellt. Die Anzahl der Inseln pro mm² hingegen war in den untersuchten, doppel-transgenen Mäusen, welche entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von Doxyzyklin im Trinkwasser gehalten wurden, vergleichbar (Abbildung 79C). Der Anteil an Inselnfläche relativ zur Gesamtfläche des Pankreas war nicht signifikant erniedrigt. Die Tabelle in Abbildung 79D gibt die quantifizierten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten wieder.

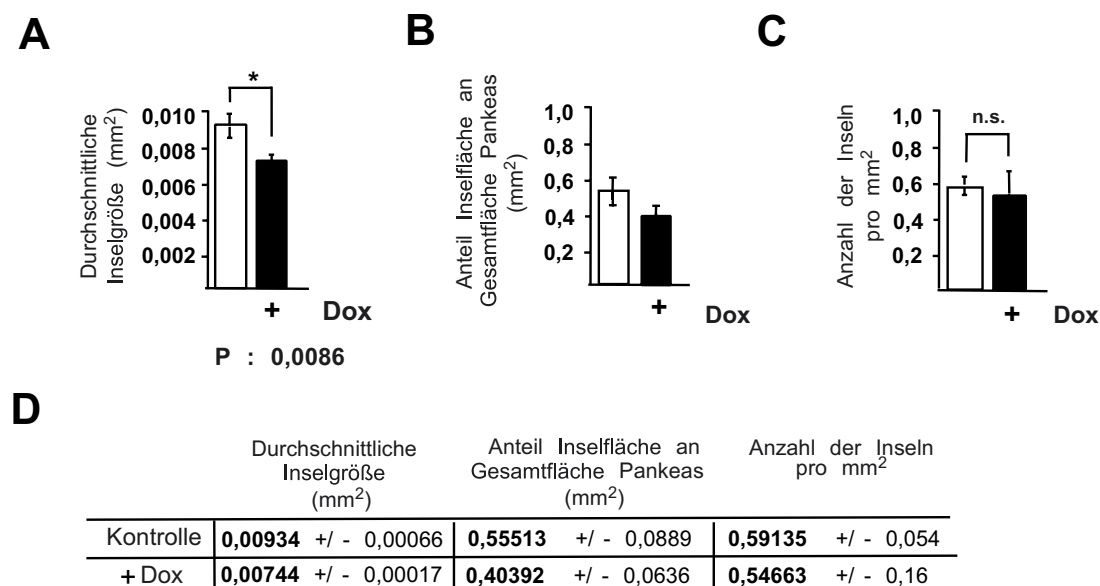


Abbildung 79: Erniedrigte β -Zellmasse durch die Expression von Egr-1/Zn in doppel-transgenen Mäusen

A-C: Säulendiagramm zeigt die Inselgröße (A), den Inselanteil an der Gesamtfläche des Pankreas (B) sowie die Anzahl an Inseln pro mm² Pankreasfläche (C) in β -Zellen der doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäuse, die für 15 Wochen in An- sowie Abwesenheit von Doxyzyklin im Trinkwasser gehalten wurden. Auswertung nach morphometrischer Analyse jedes 24.

Pankreasschnittes von 3 unabhängigen Experimenten. D: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus A-C.

Die β -Zellen wiesen ein reduziertes Wachstum auf mit der Folge, dass auch die Größe der Langerhans'schen Inseln signifikant reduziert war.

3.3.2 Rolle des Transkriptionsfaktors Elk *in vivo*

3.3.2.1 REST/Elk-1 Δ C -doppel-transgene Mäuse

Die Egr-1-Expression wird durch den ternären Komplex-Faktor Elk-1 reguliert (Thiel & Cibelli, 2002), (Rössler et al., 2006), (Mayer & Thiel, 2009), (Mayer et al., 2011), was auf die Bedeutung der proximalen SRE-Elemente innerhalb des Egr-1-Promotors zurückzuführen ist. Dies konnte in vorliegender Arbeit durch die Glukose-induzierte Egr-1-Promoteraktivität in INS-1 Zellen bestätigt werden. Aufgrund vorliegender Redundanz der einzelnen ternären Komplexfaktoren wurde zur Untersuchung von Elk-1 *in vivo* eine dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1, REST/Elk-1 Δ C, in den β -Zellen des murinen Pankreas zur Untersuchung exprimiert (Abbildung 33A, Abbildung 61A, oben). Zur Herstellung der [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäuse wurde der gereinigte Vektor in Abbildung 80A verwendet und mit den RIP-rtTA-Mäusen gekreuzt (Abbildung 80B).

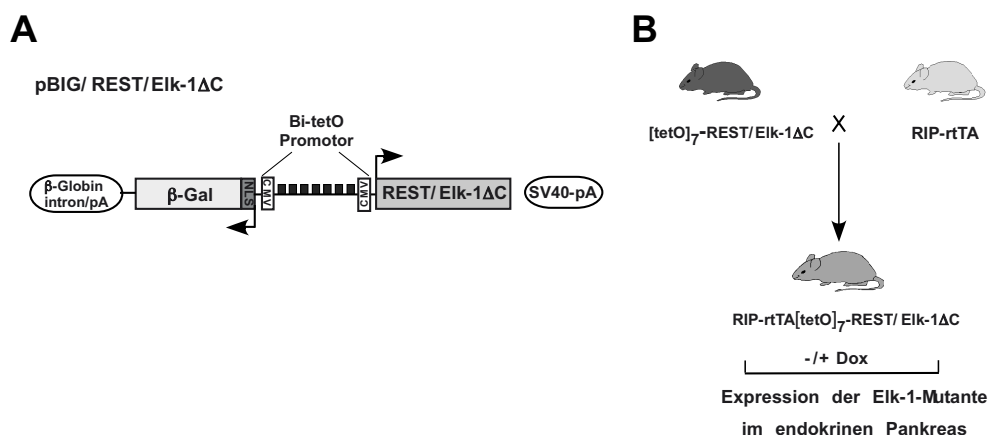


Abbildung 80: Design und Generierung der doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/ELK-1 Δ C Mäuse

A: Zur Transgenese verwendeter, aufgereinigter Teil des Vektors BIG-REST/Elk-1 Δ C, dessen bi-direktionaler tetO-Promotor die Expression von REST/Elk-1 Δ C sowie β -Galaktosidase in Anwesenheit des reversen Transaktivators rtTA ermöglicht. B: Schematische Darstellung der Erzeugung der induzierbaren doppel-transgenen Mäuse durch Kreuzung der [tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäuse mit den RIP-rtTA Mäusen.

3.3.2.2 Doozyklyn-abhängige Expression der dominant-negativen Mutante von Elk-1, REST-Elk-1 Δ C, sowie der β -Galaktosidase in den β -Zellen des Pankreas

Transgene RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäuse wurden in Ab- oder Anwesenheit von Doozyklyn gehalten, die Inseln isoliert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Abbildung 81A zeigt, dass die REST/Elk-1 Δ C Mutante nur in Inseln von Mäusen exprimiert wird, welche unter Zusatz von Doozyklyn, dem Tetracyclin-Analogon, im Trinkwasser gehalten wurden. In den Doozyklyn-unbehandelten Mäusen konnte keine Expression des Transgens detektiert werden. Immunhistochemische Untersuchungen in Kryoschnitten ergaben, dass die β -Galaktosidase nur spezifisch in Inseln und nicht im exokrinen Pankreas exprimiert wurde (Abbildung 81B). Die X-Gal-Färbung zur Identifizierung der exprimierten β -Galaktosidase wurde nur in Inseln von Doozyklyn-behandelten Mäusen detektiert.

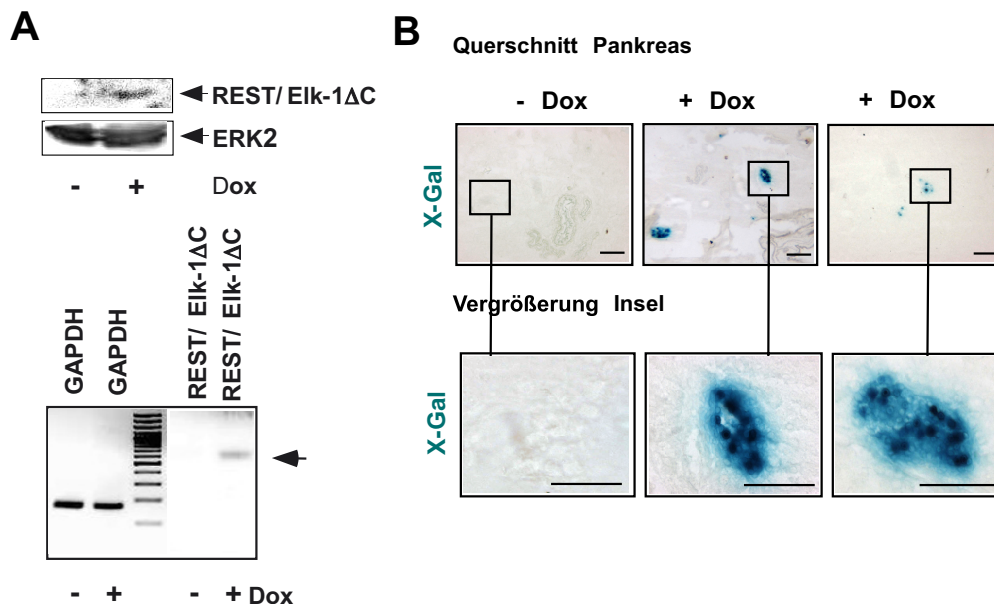


Abbildung 81: Bedingte Expression von REST/Elk-1 Δ C und β -Galaktosidase in doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C-Mäusen

A: Western Blot-Analyse von Inseln aus doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäusen, welche in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklyn im Trinkwasser gehalten wurden. Gesamtzell-extrakte wurden präpariert und im Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen das FLAG-Tag detektiert. Als Kontrolle wurde die Expression von ERK2 bestimmt. B: Histochemische, X-Gal gefärbte Kryoschnitte des Pankreas aus 4 bis 12 Wochen alten, doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1 Δ C Mäusen, welche in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklyn (Dox) im Trinkwasser gehalten wurden: Die durch X-Gal gefärbte β -Galaktosidase ist anhand blauer Färbung identifizierbar.

3.3.2.3 Verminderte Egr-1, Pdx-1 und Insulin-mRNA Menge in REST/Elk-1 Δ C exprimierenden β -Zellen

Die Auswirkung der Expression der Elk-1 Mutante auf die Egr1-Expression wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden die Inseln der doppel-transgenen RIP-

rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC-Mäuse, die in An- oder Abwesenheit von Doxyzyklin gehalten wurden, isoliert und die mRNA extrahiert. In Abbildung 82A wird gezeigt, dass durch Expression der Elk-1 Mutante die Egr-1-mRNA-Konzentration signifikant erniedrigt ist. Zusätzlich wurde ein Rückgang der Pdx-1 und Insulin mRNA-Konzentration in doppel-transgenen Mäusen nach Doxyzyklin-Gabe gemessen (Abbildung 82B, C). Diese Daten sind vorläufige Daten, da sie nur einmal erhoben wurden.

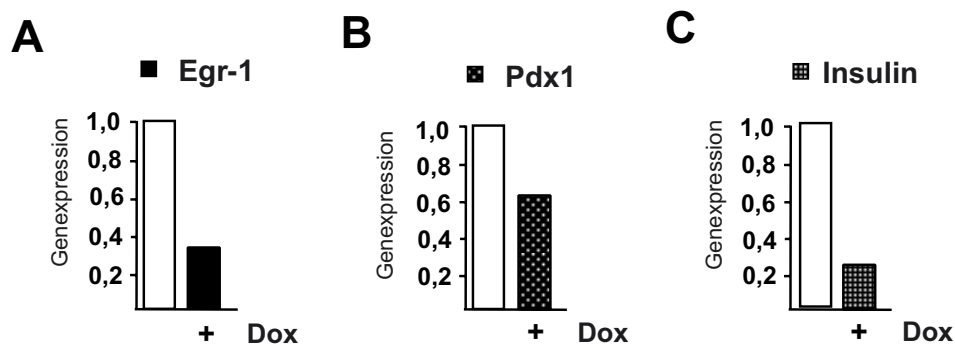


Abbildung 82: Verminderte Egr-1-, Pdx-1- und Insulin-mRNA Menge in REST/Elk-1ΔC exprimierenden Inseln

Real-time RT-PCR Quantifizierung von Egr-1 (A), Pdx-1 (B) und Insulin (C)-mRNA, welche aus Inseln von doppel-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC-Mäusen präpariert wurde, die in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin behandelt wurden.

4 Diskussion

4.1 Signaltransduktion von Glukose in Insulinoma-Zellen

4.1.1 Regulation der Transkription durch Glukose in INS-1-Zellen

Glukose, das am häufigsten vorkommende Monosaccharid in der Natur, verändert gravierend die Gentranskription in β -Zellen (Brun et al., 1993) und anderen Zellentypen (Vaulont et al., 2000). Eine Microarray-Studie zeigt, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription in MIN6 Insulinoma-Zellen spielt, die mit Glukose und cpt-cAMP stimuliert wurden (Ohsugi et al., 2004). Mehr als 200 von 755 Glukose/cAMP-regulierte Gene kodieren für Proteine, die an der Signalweiterleitung und transkriptionellen Regulation beteiligt sind. Merkwürdigerweise wurde durch Glauser et al. (2006) die Expression in Glukose und gleichzeitig cpt-cAMP-stimulierten Insulinoma-Zellen untersucht. In dieser Arbeit wurde die Regulierung der AP-1 Aktivität allein durch Glukose in INS-1 Insulinoma-Zellen analysiert, um ein Verständnis für die Mechanismen der selektiven Gentranskription nach zellulärer Stimulation zu gewinnen.

Um die transkriptionelle Aktivität von AP-1 zu messen, verwendete ich ein AP-1-responsives Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen. Reporter gene werden häufig mittels transienter Transfektion von Plasmiden in kultivierten Zellen eingebracht. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass die Struktur der unabhängigen Plasmide im Vergleich zum zellulären Chromatin unvollständig organisiert vorliegt (Smith & Hager, 1997), und mit diesem uneingeschränkten, transkriptionellen Grundzustand eher einer prokaryotischen Genorganisation ähnelt. Im Gegensatz dazu bewirkt die Chromatin-Struktur in Eukaryoten einen restriktiven Grundzustand und erschwert Proteinen wie RNA-Polymerasen und Transkriptionsregulatoren die Bindung an die DNA. Daher wurden Promotor-Reporter gene mittels lentiviralem Gentransfer zur Untersuchung der Transkriptionsmechanismen in das Chromatin integriert. Mit dieser Strategie wurde die AP-1-vermittelte Transkription des Kollagenase-/Luziferase-Gens, das somit in einer geordneten Chromatin-Struktur gepackt vorlag, analysiert. Die Analyse zeigte, dass die Stimulierung mit Glukose eine erhöhte AP-1 Aktivität in INS-1 Insulinoma-Zellen bewirkt.

Die wesentliche Rolle erhöhter Ca^{2+} -Konzentration in Glukose-stimulierten β -Zellen steht außer Frage. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der AP-1 Transkriptionsaktivität auf die Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen ist. In weiteren Experimenten wurde durch *knock-down* der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle-Subtypen $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$

in INS-1 Zellen die Wichtigkeit der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs für die Glukose-vermittelte Transkription bekräftigt. Zur Bewertung der Rolle der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen bei der Stimulus-induzierten Erhöhung der AP-1-Aktivität wurde folgende Methode angewendet: Durch Expression des Fusionsproteins Parvalbumin-mCherry im Zytosol wurde das intrazelluläres Ca^{2+} gepuffert. Die Aktivierung der AP-1 Transkriptionsaktivität war reduziert, wenn die Glukose-induzierte Erhöhung von Ca^{2+} gepuffert wurde.

In der Literatur wurde beschrieben, dass der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über L-Typ gesteuerte Spannung-abhängige Ca^{2+} -Kanäle als wesentlicher Vermittler zur ERK1/2 Aktivierung durch Glukose in INS-1-Zellen (Arnette et al., 2003) agiert. Interessanterweise führt eine Glukose-induzierte ERK1/2 Aktivierung auch zur Bindung des Transkriptionsfaktors PDX-1 an die A und E Elemente im Insulin-Promotor, wodurch dessen Expression initiiert wird (Lawrence et al., 2008b). Aus diesen Gründen wurde die Rolle von ERK bei der AP-1 vermittelten Gentranskription nach Glukosestimulation analysiert. Die Experimente zeigen, dass die Stimulation durch Glukose über ERK zur AP-1-Aktivierung führt. Darüberhinaus ist die Proteinkinase p38 und JNK bei der Regulierung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen beteiligt.

AP-1 wurde als ein Dimer aus c-Jun und c-Fos beschrieben (Curran & Franza, 1988). C-Jun ist ein zentraler Signalgeber bei intrazellulären Signalwegen und wird durch verschiedene MAP-Kinasen aktiviert. Diese Tatsache resultiert aus folgenden Beispielen: Die Stimulation des ERK1/2-Signalweges induziert die Expression von c-Jun in HeLa-Zellen (Gupta & Prywes, 2002). Dies konnte im Verlauf dieser Arbeit durch Expression eines c-Jun-Promotor/Luziferasegens nach Stimulation mit Glukose in INS-1 Zellen gezeigt werden. Eine Expression der p38-Proteinkinase zusammen mit einer konstitutiv-aktiven MKK6 induziert stark die c-Jun-Promotoraktivität in HeLa-Zellen (Gupta & Prywes, 2002). JNK phosphoryliert die Serin-Reste 63 und 73 in der NH_2 -terminalen Aktivierungsdomäne von c-Jun. Die Beteiligung von c-Jun bei der Glukose regulierten AP-1-Aktivität in Insulinoma-Zellen wurde unter Verwendung einer dominant-negativen Mutante von c-Jun, c-Jun ΔN , bestimmt. Die Induktion der AP-1-kontrollierten Reporter-gen-Aktivität wurde durch Expression von c-Jun ΔN in INS-1-Zellen fast vollständig blockiert. Dies zeigt, dass c-Jun einer der bZIP-Faktoren ist, welche den AP-1 Komplex in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen bilden.

Aktiviertes c-Jun erhöht die c-Jun-Expression durch Bindung an zwei AP-1-Bindestellen, die sich im proximalen c-Jun-Promotor befinden (Angel et al., 1988). Durch Mutation der AP-1-Bindestellen, konnten die TRE-Elemente als Glukose-responsive Elemente im c-Jun-Gen identifiziert werden. Durch Expression der dominant-negativen Mutante c-Jun ΔN in Glukose-

behandelten INS-1 Zellen wurde die Expression von endogenem c-Jun signifikant erniedrigt. Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist demnach ein AP-1-reguliertes Zielgen.

Die c-Fos-Gentranskription wird u. a. durch die Phosphorylierung der ternären Komplexfaktoren wie Elk-1 oder Sap1 reguliert (Hodge et al., 1998). Diese Proteine stellen zudem Substrate für p38 und JNK dar (Raingeaud et al., 1996), (Whitmarsh et al., 1997). Elk-1 fungiert somit als Konvergenzpunkt der zellulären Signalkaskaden. Wir haben die Notwendigkeit der ternären Komplex-Faktor-Aktivierung für die Glukose-induzierte Erhöhung der AP-1-Aktivität mit einer dominant-negativen Version von Elk-1 in *loss-of-function*-Experimenten geprüft und gezeigt, dass die Aktivierung des ternären Komplex-Faktors ein wichtiger Schritt zur Glukose-stimulierten AP-1 Aktivität ist.

4.1.2 Rolle der Ca^{2+} -Mikrodomänen bei der Glukose-regulierten Gentranskription in Insulinoma-Zellen

Die Identifizierung des bZIP-Protein c-Jun als mögliches AP-1-Zielgen sowie der Bericht über die Glukose-stimulierte Egr-1-Biosynthese (Mayer & Thiel, 2009) rief das Interesse hervor, als weitere Transkriptionsfaktoren die Familie der Leuzin-Zipper in Glukose-stimulierten INS-1 Zellen zu untersuchen. Die Analyse der AP-1-Komplexparker c-Fos sowie CREB in Glukose-behandelten INS-1-Zellen zeigte, dass diese bZIP-Proteine ebenfalls durch Ca^{2+} reguliert werden und eine Aktivierung der ERK involviert.

Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielt eine wichtige Rolle bei der Glukose-stimulierten Gentranskription in β -Zellen des Pankreas. Zahlreiche Veröffentlichungen liefern kontroverse Aussagen über die Bedeutung der Ca^{2+} -Mikrodomänen bezüglich der Gentranskription. Es wurde postuliert, dass verschiedene Ca^{2+} -Mikrodomänen eine unterschiedliche Auswirkung auf die Ca^{2+} -induzierte Promoteraktivität von Genen hat: Die SRE-vermittelte Transkriptionsaktivität sollte durch zytosolisches Ca^{2+} und die CRE-vermittelte Transkriptionsaktivität durch Ca^{2+} im Kern aktiviert werden (Hardingham et al., 1997, 2001). Konträr dazu wurde berichtet, dass nukleares Ca^{2+} , aber nicht Ca^{2+} des Zytoplasmas, die Aktivität eines GAL4-Elk-Fusionsproteins reguliert (Pusl et al., 2002). Der ternäre Komplexfaktor initiiert zusammen mit SRF die Aktivierung von SRE-Elementen. Fragwürdig für die Hypothese scheint, dass weder klar ist, ob neben der Diffusion der Ca^{2+} -Ionen durch die Kernmembran (Eder & Bading, 2007) ein aktiver Austausch über den NPC stattfindet, noch welche Rezeptoren bei diesem Transport beteiligt sind und wo diese sich befinden (Gerasimenko & Gerasimenko, 2004). Die Tatsache, dass

das Lumen des NE und des ER miteinander verbunden sind, lässt die Überlegung zu, dass Ca^{2+} von einem Membran-System ins andere diffundieren kann (Wu & Bers, 2006) und verschiedene nukleare oder zytoplasmatischen Ca^{2+} -Pools nicht unterschieden werden können.

Es gibt verschiedene Methoden zur Analyse der Auswirkung veränderter Ca^{2+} -Konzentrationen, z. B. die Messung zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration mittels fluoreszierender Farbstoffe (Wolheim & Biden, 1986). Eine weitere Studie basiert auf der Kern-Mikroinjektion eines diffusions-unfähigem Ca^{2+} -Puffers in Einzelzellen (Hardingham et al., 1997). Diese Techniken und weitere publizierte Strategien haben den Nachteil, dass sie nicht zur Ausführung der biochemischen Analysen förderlich sind, die *in vivo*-Situation verfälschen und zudem in β -Zellen schwer anwendbar sind (Wolheim & Biden et al., 1986). Organische Fluorochrome besitzen zudem im Zytosol und Kern verschiedene Charakteristika (Bootman et al., 2009). In dieser Arbeit wurde ein Ca^{2+} -Bindeprotein, das Parvalbumin, im Kern oder im Zytoplasma exprimiert (Pusl et al., 2002). Kritisch an den Daten von Pusl et al. (2002) ist, dass durch Analyse eines Gal4-Reporter-Systems nur eine 1,6-fache Stimulation erreicht wurde, so dass der Ca^{2+} -hemmende Effekt von Parvalbumin nicht zur Geltung kommen kann. Die Pufferung von Ca^{2+} durch die gezielte Expression von Ca^{2+} -Bindeproteinen im Kern stellt eine präzise Methode zur Funktionsanalyse von Ca^{2+} dar – ohne dabei die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu verändern (Bootman et al., 2009). Das verwendete Parvalbumin ist ein hochaffines Ca^{2+} -Bindeprotein, indem *EF-hand*-Motive mit geladenen Aminosäuren die Bindung von Ca^{2+} -Ionen ermöglichen. Durch die Aktivierung der AP-1-, TRE-, CRE- und SRE-regulierten Reportergene bei Expression der Ca^{2+} -Bindeproteinen im Kern oder Zytoplasma konnte die essentielle Rolle der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei der Ca^{2+} -induzierten Transkription gezogen gezeigt – ohne dabei die Glukose-induzierte Ca^{2+} -Konzentration zu manipulieren.

Die Bedeutung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wurde durch weitere Experimente untermauert. In Glukose-stimulierten INS-1-Zellen konnte die Ca^{2+} -induzierte Aktivierung der zytoplasmatischen Proteinkinase ERK identifiziert werden. Die Inhibierung der stromaufwärts agierenden Kinase von ERK, MEK, mittels pharmakologischer und genetischer Hilfsmittel blockierte vollständig die Glukose-induzierte Transkription der Reportergene, die unter der Kontrolle des c-Jun-Promotors, des Egr-1-Promotors oder eines CRE-regulierten Promotors, der mehrere CREs standen.

Die Aktivierung von ERK führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der ternären Komplexfaktoren sowie die Aktivierung von CREB, wodurch vor allem Gene transkribiert

werden können, die ein SRE oder CRE in ihrer regulatorischen Region aufweisen (Mayer & Thiel, 2009). Ein Beispiel eines Gens, das beide regulatorische Elemente besitzt, ist das Egr-1-Gen. Interessant im Bezug auf die Debatte ist, dass die Regulierung der SRE-regulierten Gene auch Ca^{2+} -regulierte Enzyme im Zellkern benötigen: Die Ca^{2+} -aktivierte Protein-Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und inaktiviert den ternären Komplexfaktor Elk-1 (Mayer & Thiel, 2009).

Das *cAMP response element* (CRE), welches die CREB-gesteuerte Gentranskription vermittelt (Bowlus et al., 1991), wurde zusätzlich als *Ca²⁺ response element* (CaRE) (Sheng et al., 1990) benannt, da dessen Aktivierung nicht nur durch cAMP (Jhala et al., 2003) sondern auch als Ergebnis erhöhter zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration sowie Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Proteinkinasen aktiviert, wie später in der Literatur veröffentlicht wurde (Sheng et al., 1990). CREB wird in Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen phosphoryliert und aktiviert. Die Phosphorylierung jedoch gilt nicht als zuverlässiges Indiz der tatsächlichen CREB Zielgen-Aktivierung (Zhang et al., 2005). Von daher wurde direkt die CRE-kontrollierte Transkription gemessen. Die erhaltenen Resultate zeigen eindeutig, dass die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma als starker Stimulus zur Transkription der CREB-regulierten Gene via MEK/ERK-Aktivierung fungiert und nukleäres Calcium dabei nicht essentiell ist.

Die Stärke, die Dauer sowie die subzelluläre Lokalisation von Ca^{2+} -Signalen wird durch Ca^{2+} -speichernde Organellen mit deren Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Austauschen aktiv verändert. Ca^{2+} -Ionen können durch Mitochondrien aufgegriffen und dann langsam an das Zytosol über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher abgegeben werden. In sensorischen Neuronen z. B. wurde gezeigt, dass eine verlängerte Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien eine Aktivierung von NFAT begünstigt (Kim et al., 2009). Das Endoplasmatische Retikulum (ER) dient als Quelle und Speicher für Ca^{2+} -Ionen und kann eine zusätzliche Rolle bei der Regulierung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration einnehmen. Eine Überexpression von Calumenin, ein ER- Ca^{2+} -Bindeprotein der CREC-Familie (Honoré, 2009), führte zu keiner signifikanten Änderung der Glukose-induzierten Gentranskription in INS-1-Zellen, woraus zu schließen ist, dass die Ca^{2+} -Ionen im ER keinen Einfluss auf die Signalkaskade nehmen, die durch den Ca^{2+} -Einstrom via L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und der daraus folgenden MEK/ERK Aktivierung resultiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des mitochondrialen Proteins Fis-1 auf die Ca^{2+} -regulierte Transkription untersucht. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Überexpression von Fis-1 die Glukose-induzierte Erhöhung der Reporter-gen-Transkription in Insulinoma-Zellen. Fis-1 ist ein kleines Protein, das in der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist und eine regulatorische Rolle bei der Fission des Mitochondriums einnimmt. Eine

Überexpression dieses Proteins in Insulinoma-Zellen führte, wie eine andere Arbeitsgruppe berichtet (Park et al., 2008), zur mitochondrialen Fragmentierung und zum verringerten Volumen. Dadurch resultierte ein erniedrigtes ATP-Level. Fis-1 reduzierte die Glukose-stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung aufgrund eines mitochondrialen Ungleichgewichts durch veränderte ATP-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu hatte eine Fis-1-Überexpression keine Auswirkung bei der KCl-induzierten Ca^{2+} -Erhöhung, da Glukose im Gegensatz zu KCl über die Mitochondrien und deren ATP-Metabolismus wirkt (Park et al., 2008). Aufgrund der Tatsache, dass ATP den Nährstoffmetabolismus mit der Membrandepolarisation und dem Ca^{2+} -Einstrom in β -Zellen des Pankreas verknüpft, ist es naheliegend, dass Ca^{2+} -abhängige Prozesse wie die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung (Park et al., 2008) und die Glukose-stimulierte Gentranskription durch eine Überexpression von Fis-1 negativ beeinflusst werden. Derart beeinflusste Ca^{2+} -Signale, die durch Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum moduliert werden, beeinflussen die Regulierung der Transkription von Ca^{2+} -responsiven Transkriptionsfaktoren.

4.2 Signaltransduktion von Pregnenolonsulfat in INS-1-Zellen

Die molekulare Zellbiologie der β -Zellen zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeit mit der von Neuronen. Neuronale Gene werden nicht nur in Neuronen, sondern auch in endokrinen Zellen exprimiert (synaptische Vesikelproteine und Neurotransmitter). Damit im Einklang wurde vor kurzem berichtet, dass das Neurosteroid Pregnenolonsulfat in Insulinoma und β -Zellen durch Auslösen eines schnellen Ca^{2+} -Einstroms in die Zellen zu verstärkter Insulin-Sekretion führt (Wagner et al., 2008). Aufgrund dieser Ähnlichkeit zwischen der Pregnenolonsulfat-Signalkaskade und der Glukose-Signalkaskade sowie der Ergebnisse von Mayer et al. (2011) war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die durch Pregnenolonsulfat-induzierte Signalkaskade bezüglich der Transkriptionsregulation in Insulinoma-Zellen zu untersuchen.

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verstärkt die Egr-1 Gentranskription. Egr-1 ist somit ähnlich wie CREB, NF- κ B ein Ca^{2+} -regulierter Transkriptionsfaktor (Thiel et al., 2010). Die Aktivierung von PKC und ERK verbindet das Ca^{2+} -Signal mit der erhöhten Transkription des Egr-1 Gens (Thiel et al., 2010). Interessanterweise induziert Pregnenolonsulfat eine anhaltende ERK2-Aktivierung im Hippocampus (Chen et al., 2010). Durch Verwendung genetischer und pharmakologischer Hilfsmittel konnte gezeigt werden, dass die ERK-Aktivierung in Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen zur Egr-1-vermittelten Transkription notwendig ist. Eine erhöhte Egr-1-Genexpression konnte nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat in den INS-1-Zellen und isolierten, murinen Inselzellen aus

der Maus in Primärkultur festgestellt werden. Interessanterweise sind die Moleküle, die bei der erhöhten Egr-1 Expression nach Pregnenolonsulfat-Stimulation induziert sind, auch in den Glukose-stimulierten Insulinoma-Zellen notwendig (Bernal-Mizrachi et al., 1995), (Josefsen et al., 1999), (Mayer & Thiel, 2009).

Zur Messung der AP-1 Transkriptionsaktivität wurde das AP-1 responsive Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen mittels lentiviralen Gentransfers in das Chromatin von INS-1-Zellen integriert. Diese Resultate zeigten, dass eine Stimulation mit Pregnenolonsulfat eine erhöhte AP-1 Aktivität in INS-1-Zellen induziert. Die Analyse der bZIP-Proteine mit AP-1 Bindungscharakter zeigte, dass Pregnenolonsulfat die c-Jun und c-Fos-Biosynthese in INS-1 und isolierten Inseln des Pankreas verstärkt. Mit Hilfe eines mutierten c-Jun-Promotor/Reportergens, dessen AP-1 ähnlichen Bindestellen, auch als TRE-Stelle bezeichnet, deletiert wurden, konnte das TRE-Element als Pregnenolonsulfat-sensitives Element identifiziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Glukose und Pregnenolonsulfat-ähnliche Signalwege in Insulinoma und β -Zellen induzieren.

Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 verknüpft die ERK-Signalkaskade mit der SRE-vermittelten Transkription. Es wurde gezeigt, dass phosphoryliertes Elk-1 unter physiologischen Bedingungen an die regulatorische Region des Egr-1 Gens in Pregnenolonsulfat-stimulierten Insulinoma-Zellen bindet (Mayer & Thiel, 2009). Die Notwendigkeit der ternären Komplexfaktor-Aktivierung konnte durch die Verwendung der dominant-negativen Mutante Elk-1 für die c-Fos-Transkription gezeigt werden.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt die Stimulation mit Glukose zur Phosphorylierung von CREB (Wang et al., 2008), (Mayer & Thiel, 2009). Übt die Pregnenolonsulfat-Signalkaskade den gleichen Effekt aus? Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Chen et al., 2007) unterstützt, die zeigen, dass eine Phosphorylierung von CREB in Zellen des Hippocampus durch Stimulation mit Pregnenolonsulfat induziert wird. In Pregnenolonsulfat-stimulierten INS-1-Zellen konnte dieser Phosphorylierungsstatus von CREB detektiert werden. Unter Verwendung eines ausschließlich durch CRE-kontrollierten Reportergens wurde die Aktivität von CREB gezeigt.

Pregnenolonsulfat-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle in INS-1-Zellen

Der Pregnenolonsulfat-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in Neuronen kann durch Stimulierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs erfolgen (Chen & Sokabe, 2005) (Hige et al., 2006) (Chen et al., 2010) und ist ebenfalls ein häufig genutzter Mechanismus in den β -Zellen des Pankreas. Unter Verwendung verschiedener pharmakologischer Hilfsmittel

sowie der Verwendung einer shRNA, spezifisch gegen den Subtyp $\text{Ca}_v1.2$ der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, wurde gezeigt, dass die Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle essentiell für Pregnenolonsulfat-induzierten Signaltransduktion in INS-1-Zellen sind. Somit stellt die Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle ein Bindeglied in der Pregnenolonsulfat-ausgelösten Signalkaskade in Neuronen sowie in β -Zellen des Pankreas dar.

Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) ist ein Ca^{2+} -permeabler, nichtselektiver Kationenkanal, der durch das Steroid Pregnenolonsulfat aktiviert wird (Wagner et al., 2008), (Vriens et al., 2011). Es wird vermutet, dass TRP-Proteine bei der Glukose-stimulierten Insulinsekretion in den β -Zellen eine Membran-depolarisierende Funktion ausüben. Die dadurch erzeugte Spannung erleichtert die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in β -Zellen, so dass die Membrandepolarisation fortschreiten kann (Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008). Die Ca^{2+} -Kanäle TRPM3 sowie spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs sind Zielstrukturen bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Signaltransduktion in Insulinoma-Zellen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in INS-1-Zellen, welche in 11 mM Glukose-haltigem Medium kultiviert wurden, die Pregnenolonsulfat-induzierte Erhöhung von Egr-1 eine Aktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle voraussetzt. Die Glukose-Konzentration von 11 mM genügt zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Gromada & Dissing, 1996), wobei TRPM3 unter diesen Bedingungen keine Rolle spielt (Mayer et al, 2011), (Kindmark et al, 1991). Die Bedeutung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle und TRPM3 bei geringer Glukose-Konzentration (2 mM) wurde mittels pharmakologischer und genetischer Methoden genauer analysiert. Diese Experimente zeigten, dass TRPM3 sowie L-Typ Ca^{2+} -Kanäle zur Pregnenolonsulfat-vermittelten Genexpression in INS-1-Zellen bei 2 mM Glukose unerlässlich sind. Es ist daher denkbar, dass die Aktivierung der TRPM3-Kanäle durch Pregnenolonsulfat-Stimulation einen anfänglichen Ca^{2+} -Einstrom induziert, der die Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bewirkt. Der durch die TRPM3-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom scheint für die Signalweiterleitung in den Kern nicht ausreichend, da die Pregnenolonsulfat-induzierte Gentranskription in Verapamil-vorbehandelten Zellen verhindert wird und somit auf die Notwendigkeit der zusätzlichen Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle hinweist. Im Gegensatz dazu genügt eine Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle durch Glukose oder KCl/FPL bei der Stimulus-induzierten Gentranskription. In diesem Kontext wurde die Rolle von Pregnenolonsulfat bei der Aktivierung der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in corticotrophen Zellen der Hypophyse untersucht. Wie beschrieben (Cruzalegui et al., 1999), wurden die AtT20 Zellen

dazu verwendet, die Aktivierung von AP-1 bzw. die Biosynthese von c-Jun und c-Fos nach Stimulation mit KCl/FPL zu analysieren. Die AtT20 corticotrophen Zellen exprimieren die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal-Subtypen $\text{Ca}_v1.2$ und $\text{Ca}_v1.3$, aber nur wenig TRPM3. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Expression von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle zur Aktivierung der Pregnenolonsulfat-induzierten Transkription in AtT20 Zellen nicht genügt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Expression der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle von der Expression eines weiteren Ca^{2+} -Kanals, wie z. B. der NMDA-Rezeptor in Neuronen oder TRPM3 in INS-1-Zellen, begleitet werden muss, um die Pregnenolonsulfat-regulierte Gentranskription zu initiieren.

4.3 Regulation der Insulinbiosynthese, des Blutglukosespiegels und der Proliferation in β -Zellen des murinen Pankreas

4.3.1 Die zentrale Rolle der Egr-Transkriptionsfaktoren

Glukose verändert die Zellmasse der Insulin-produzierenden β -Zellen (Bonner-Weir et al., 1989). Dieser Effekt wird durch den anfänglichen Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst, der in Folge eine Vielzahl an Wachstums-regulierenden Signalwegen initiiert (Bernal-Mizrachi et al., 2010) und u. a. den ERK-Signalweg einschließt. Einer der *downstream*-Haupteffektoren des ERK-Signalwegs ist der Egr-1-Transkriptionsfaktor, der die Ca^{2+} -Signale mit einer veränderten Gentranskription verbindet.

Die Biosynthese des Egr-Transkriptionsfaktors wird durch verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle wie Hormone, Neurotransmitter, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert, was auf die Rolle der Egr-Faktoren als Konvergenzpunkt für viele intrazelluläre Signalkaskaden hinweist. Egr-1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in der Regel als transkriptioneller Aktivator fungiert. Dem Transkriptionsfaktor werden viele biologische Funktionen zugeschrieben, so z. B. die Proliferation (Mayer et al., 2009), (Liao et al., 2004), der neuronale Zelltod (Xie et al., 2011), die Reproduktion (Lee et al., 1996). Die Funktionen von Egr-Proteinen des endokrinen Pankreas sind bisher nicht bekannt. Basierend auf Versuchen mit Insulinoma-Zellen wurde eine Korrelation zwischen der Egr-1 Biosynthese und einer verstärkten Transkription des Insulin-kodierenden Gens hergestellt. Dabei transaktiviert Egr-1 das Insulin-Gen nicht direkt, sondern verstärkt die Transkription des PDX-1-Gens, das für das Homeoboxprotein (Pdx-1) kodiert (Mayer et al., 2011), (Eto et al., 2007), (Melloul et al., 1993). Pdx-1 ist ein starker Aktivator der Insulin-Gentranskription. In Insulinoma-Zellen wird die Egr-1-Biosynthese (Mayer & Thiel, 2009) sowie die Pdx-1-Genexpression nach Stimulation mit Glucose stark hochreguliert, wie vorliegende Arbeit

zeigt. Die Rolle des Egr-1-Transkriptionsfaktors bei der Glukose-Homöostase und der β -Zell-Proliferation im Pankreas *in vivo* wurde untersucht.

Egr-Proteine besitzen stark homologe DNA-Bindedomänen, mit denen sie an GC-reiche Zielsequenzen binden. Für Astrozyten, die aus Egr-1-defizienten Mäusen isoliert waren, wurde eine funktionelle Redundanz zwischen den Egr-Proteinen nachgewiesen (Mayer et al., 2009) und auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Tourtellotte et al., 2000), (Costello et al., 2010). Vorliegende Arbeit und Untersuchungen der letzten Jahren testeten die biologischen Funktionen der dominant-negativen Mutante von Egr-1 an isolierten Zellen bzw. Zelllinien (Al-Sarraj et al., 2005), (Mayer et al., 2008b), (Rössler & Thiel, 2009), (Mayer & Thiel, 2009), (Mayer et al., 2009), (Müller et al., 2010). Die Mutante interagiert außer mit Egr-1 auch mit den restlichen Egr-Transkriptionsfaktoren am Zielgen (Mayer et al., 2009).

Um die Funktionen von Genen besser verstehen zu können, ist ihre Analyse *in vivo* unumgänglich. Egr-1^{-/-} sowie Egr-2^{-/-} Mäuse sind steril. Zur Umgehung der Problematik von der Kompensation und der Letalität wurde zur Aufklärung der Funktionen von Egr-1 im endokrinen Pankreas ein transgenes Mausmodell generiert, in denen induzierbar die dominant-negative Mutante von Egr-1, Egr-1/Zn, in den β -Zellen exprimiert wird. Dieses Expressionssystem wurde derart generiert, dass die Expression der Mutante auf die β -Zellen des Pankreas beschränkt ist, zeitlich induzierbar ist und somit Effekte der Transgenexpression während der Entwicklung auszuschließen sind. Die Strategie der konstanten Expression von dominant-negativen Mutanten in den β -Zellen von transgenen Mäusen wurde bereits erfolgreich von anderen Arbeitsgruppen angewandt, z. B. zur Erforschung der Rolle des Transkriptionsfaktors A-CREB in β -Zellen (Jhala et al., 2003). Die Analyse von doppelt-transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇Egr-1/Zn-Mäusen zeigte, dass die Gabe von Doxyzyklin zum Trinkwasser zu einer starken Expression von β -Galaktosidase ausschließlich in den β -Zellen führt und die Egr-1 Mutante exprimiert wird. Zur Kontrolle der Auswirkungen des Aktivators Doxyzyklin auf den Metabolismus der Mäuse wurden Mäuse generiert, die das Transgen [tetO]₇Egr-1/Zn besitzen, aber keinen zur Expression notwendigen rtTA-Aktivator exprimieren.

Beeinflusst die Expression der dominant-negativen Mutante von Egr-1 die Insulin-Biosynthese und -sekretion der β -Zellen? Immunhistochemische Untersuchungen isolierter Inseln und des gesamten Pankreasgewebes sowie RT-PCR-Analysen zeigten, dass die Expression der Egr-1-Mutante zu einer reduzierten Expression von Insulin führt. Ich konnte nachweisen, dass die Expression von Egr-1/Zn zu einer verminderten Expression von PDX-1 führt, wie dies bereits für die INS-1-Zellen postuliert wurde.

Erniedrigte Insulinkonzentrationen im Blut verschlechtern die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme, was zu einer Hyperglykämie führt. Im Glukose-Toleranztest war die Blutglukosekonzentration der Mäuse, die Egr-1-Mutante exprimierten, über einen längeren Zeitraum erhöht. Die Abnormitäten der Blutglukose waren von erniedrigten Insulinpegeln begleitet. Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Expression der Egr-1-Mutante eine direkte Auswirkung auf die Glukose-Homöostase hat. Ein ähnliches Expressionssystem wurde für den Transkriptionsfaktors NFATc1 und den Inhibitor κ B in β -Zellen verwendet mit dem Resultat einer erhöhten Insulin- und Pdx-1-Expression sowie eines erniedrigten Blutglukosespiegels (Heit et al., 2006).

Kürzlich wurde belegt, dass Egr-1 in MIN6 Insulinoma-Zellen das bFGF-Gen transaktiviert und dass Egr-1 und die verwandten Proteine Egr-2 und Egr-3 für die Proliferation von Astrozyten nach EGF-Stimulation notwendig sind (Mayer & Thiel, 2009). Basierend auf diesen Befunden wurde postuliert, dass Egr-Proteine in den β -Zellen des Pankreas als Zellwachstums-Kontrollfaktoren agieren. Sollte die Expression der Transgene die Entwicklung des endokrinen Pankreas negativ beeinflussen, würde die Bildung von kleineren Inseln bzw. eine reduzierte Anzahl an Inseln pro Schnitt erwartet. Die Analyseergebnisse bestätigen diese Hypothese: Die Langerhans'schen Inseln waren in den Mäusen, die das Egr-1/Zn-Transgen exprimierten, signifikant kleiner und zeigten eine reduzierte Expression von PCNA, eines Proliferationsmarkers. Zudem konnte ich bei diesen Mäusen einen verminderten Einbau von BrdU in die DNA der β -Zellen konstatieren. Damit konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Egr-Transkriptionsfaktoren auch die Proliferation der β -Zellen im Pankreas kontrolliert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früher veröffentlichten Daten, aus denen hervorgeht, dass durch Expression einer Egr-1-spezifischen siRNA die Proliferation in INS-1-Zellen abnimmt (Garnett et al., 2005).

4.3.2 Die Rolle des Transkriptionsfaktors Elk-1 *in vivo*

Die Egr-1 Expression wird durch den ternären Komplex-Faktor Elk-1 reguliert (Thiel & Cibelli, 2002), (Rössler et al., 2006), (Mayer & Thiel, 2009), (Mayer et al., 2011). In Säugetieren gibt es drei TCFs: Elk-1, SAP-1 und SAP-2. Durch *gene-targeting*-Experimente wurde nachgewiesen, dass der Verlust eines TCFs durch andere TCFs kompensiert wird (Costello et al., 2010), (Ayadi et al., 2001). Transgene Mäuse, die weder Elk-1 noch SAP-1 exprimieren, sind zudem infertil (Costello et al., 2010). Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 (REST/Elk-1 Δ C) blockiert wahrscheinlich die Aktivität von allen

drei TCFs. Diese Mutante hemmt die Egr-1-Biosynthese in stimulierten Insulinoma-Zellen, Fibroblasten, Astrozyten und gonadotropen Zellen der Hypophyse (Mayer & Thiel, 2009), (Mayer et al., 2008b), (Rössler & Thiel, 2009). Zur Aufklärung der Funktionen von Elk-1 im endokrinen Pankreas wurde ein transgenes Mausmodell etabliert, in dem induzierbar die dominant-negative Mutant von Elk-1, REST/Elk-1 Δ C, in den β -Zellen exprimiert wurde. Zur Erstellung der Mauslinien wurde das gleiche induzierbare Tet-On-Expressionssystem verwendet, das bereits für die Expression der Mutante Egr-1/Zn erfolgreich benutzt wurde. Im Verlauf dieser Arbeit konnten doppelt-transgene Mäuse generiert werden, die REST/Elk-1 Δ C und β -Galaktosidase induzierbar in den β -Zellen des Pankreas exprimieren.

Eine vorläufige Real-time RT-PCR-Analyse der mRNA von isolierten Inseln zeigte, dass die Expression der Elk-1-Mutante zu einer reduzierten Expression von Egr-1 führt. Wie wir postuliert hatten, war die Expression von Insulin sowie Pdx-1 in REST/Elk-1 Δ C - exprimierenden Mäusen nachweislich reduziert.

5 Zusammenfassung

Die Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut verändert gravierend die Gentranskription in den β -Zellen des Pankreas. Glukose induzierte via Membrandepolarisation einen Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs. Basierend auf einer *Micro-Array*-Studie wurde postuliert, dass Glukose spezifisch *activator protein 1* (AP-1)-regulierte Gene aktiviert. Die Regulation der AP-1-Aktivität wurde in INS-1 Insulinoma-Zellen untersucht. Eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führte zur Aktivierung von AP-1 und der basischen Leuzinzipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun. Eine erhöhte AP-1 Aktivität bedarf der Aktivierung der Protein-Kinase *ERK*, der p38 Protein-Kinase sowie der c-Jun NH_2 -terminalen Proteinkinase (JNK). Der ternäre Komplexfaktor Elk-1 sowie c-Jun sind an der Regulierung der AP-1 Aktivität in Glukose-stimulierten INS-1-Zellen beteiligt. Das *phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA)-responsive element* (TRE) konnte als Glukose-responsives Element im c-Jun- Gen identifiziert werden.

Die Analyse von Ca^{2+} -Mikrodomänen zeigte, dass die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration bei der Glukose-stimulierten Transkription von AP-1, CRE- sowie TRE-kontrollierten Reportergenen in Insulinoma-Zellen von essentieller Bedeutung ist. Die Expression von Ca^{2+} -puffernden Proteinen im Kern oder im ER hatten keinen Effekt auf die Ca^{2+} -induzierte Gentranskription. Eine Beeinträchtigung des ATP-Metabolismus durch Überexpression des mitochondrialen Membranproteins Fis-1 bewirkte hingegen eine Änderung der Ca^{2+} -induzierten Transkription.

Das Steroid Pregnenolonsulfat stimuliert einen Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs in Insulinoma-Zellen. Dies führte zur Aktivierung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Egr-1 und der bZIP-Proteine c-Jun, c-Fos und CREB. Jedoch wird die Aktivierung des TRPM3- Ca^{2+} -Kanals bei der Pregnenolonsulfat-stimulierten Gentranskription zusätzlich benötigt, wenn eine geringe Glukose-Konzentration von 2 mM im Medium vorliegt und die Zelle nicht ausreichend depolarisiert ist. Als Pregnenolonsulfat-*responsive* Elemente konnten das TRE und das *cyclic AMP (cAMP) response element* (CRE) identifiziert werden.

Die Rolle der Egr-Transkriptionsfaktoren wurde in einem neu geschaffenen Mausmodell untersucht. Dazu wurden unter Verwendung des Tetracyclin-regulierten Expressionssystems transgene Mäuse generiert, die eine dominant-negative Mutante von Egr-1, Egr-1/Zn, in β -Zellen des Pankreas Zelltyp-spezifisch und induzierbar exprimierten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Egr-Proteine eine wichtige Rolle als Regulatoren der Glukose-Homöostase bei der Kontrolle der Insulin-Biosynthese und -Serumkonzentration sowie der Proliferation in β -Zellen des Pankreas spielen.

6 Summary

Elevation of blood glucose changes seriously the transcriptional pattern of pancreatic β -cells. By depolarisation of the membrane, glucose induced a rapid influx of Ca^{2+} ions through voltage-gated L-type Ca^{2+} channels. Based on a microarray study, it was postulated that glucose specifically activates *activator protein 1 (AP-1)* regulated genes. The regulation of AP-1 activity was examined in INS-1 insulinoma cells. The elevated cytoplasmic Ca^{2+} concentration activated AP-1 and *the basic leucine zipper (bZIP)* transcription factors c-Fos and c-Jun. Activation of the protein kinase *ERK*, *p38 MAP* kinase and *c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK)* connect the cytoplasmic Ca^{2+} signal with the enhanced AP-1 mediated gene transcription. The *ternary complex factor Elk-1* as well as c-Jun are involved in the regulation of the AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. Finally, I identified the *phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA)-responsive element (TRE)* within the c-Jun gene as a *glucose responsive element*.

The analysis of Ca^{2+} microdomains showed the importance of elevated cytoplasmic Ca^{2+} ions for glucose-induced transcription of AP-1-, CRE- und TRE-controlled reporter genes in insulinoma cells. The expression of Ca^{2+} binding proteins in the nucleus or ER had no effect on Ca^{2+} -stimulated gene transcription. In contrast, an impairment of the mitochondrial ATP metabolism by expression of the mitochondrial membrane protein Fis-1 led to a changed Ca^{2+} -induced gene transcription.

The neurosteroid pregnenolone sulfate induces a Ca^{2+} influx via voltage-gated L-type Ca^{2+} channels in insulinoma cells. This led to activation of the *zincfinger transcription factor Egr-1* and the bZIP proteins c-Jun, c-Fos und CREB. In contrast, TRPM3- Ca^{2+} channels are additionally required when the glucose level is low with 2 mM in medium and the cell is not sufficiently depolarized. I identified the TRE and the *cyclic AMP (cAMP) response element (CRE)* as *pregnenolone sulfate response elements*.

Moreover, the role of Egr transcription factors was analyzed in a new generated mice model. For this aim, transgenic mice have been generated by using the tetracycline-based expression system to express cell-specifically and inducible a dominant-negative mutant of Egr-1, Egr-1/Zn, in pancreatic β -cells. The experiments show that the Egr proteins act as important regulators of the glucose homeostasis by controlling insulin biosynthesis, serum insulin concentrations and proliferation of pancreatic β -cells.

7 Literaturverzeichnis

1. Akk G, Bracamontes J, Steinbach JH. (2001). Pregnenolone sulfate block of GABAA receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the α subunit. *J Physiol* , 532:673–84.
2. Ahren B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion-Implications for health and disease. *Diabetiol* , 43:393-410.
3. Al-Sarraj A, Day RM, Thiel G. (2005). Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J Cell Biochem* , 94:153–67.
4. Alam J & Cock JL. (1990). Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* , 188:245-254.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (2nd ed). New York: Garland Science.
6. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* , 270:27489–94.
7. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. (1987). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer located in the 50 flanking region. *Mol Cell Biol* , 7:2256–66.
8. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* , 55:875–85.
9. Arnette D, Gibson TB, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA, Cobb MH. (2003). Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic β cells. *J Biol Chem* , 278:32517–25.
10. Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K, Impey S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* , 24:4324-32 .
11. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban P, Wollheim C. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting. *Endocrinology* , 130:167-78.
12. Ayadi A, Zheng H, Sobieszczuk P, Buchwalter G, Moerman P, Alitalo K, Wasylyk B . (2001). Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1. *MBO J* , 20:5139–52.
13. Ayala JE, Streeper RS, Svitek CA, Goldman JK, Oeser JK, O'Brien RM. (2002). Accessory elements, flanking DNA sequence, and promoter context play key roles in determining the efficacy of insulin and phorbol ester signaling through the malic enzyme and collagenase-1 AP-1 motifs. *J Biol Chem* , 277:27935–44.
14. Babenko AP & Bryan J. (2003). Sur domains that associate with and gate K_{ATP} pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* , 278:41577–80.

15. Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP. (2000). Integration of the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF- dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine* , 12:1469-79.
16. Bauer I, Al Sarraj J, Vinson C, Larsen R, Thiel G. (2007). Interleukin-1 β and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor α in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *J Cell Biochem* , 100:242-55.
17. Bauer I, Hohl M, Al-Sarraj A, Vinson C, Thiel G. (2005). Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase. *Arch Biochem Biophys* , 438:36-52.
18. Baulieu EE. (1998). Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinol* , 23:963-87.
19. Bernal-Mizrachi E, Cras-Méneur C, Ye BR, Johnson JD, Permutt MA. (2010). Transgenic Overexpression of Active Calcineurin in β -Cells Results in Decreased β -Cell Mass and Hyperglycemia. *PLoS ONE* , 5:e11969.
20. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Srinivasan S, Klenk A, Cohen D, Permutt MA. (2001). Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells . *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 281:E1286–99.
21. Bernal-Mizrachi E, Wice B, Inoue H, Permutt MA. (2000). Activation of serum response factor in the depolarization induction of Egr-1 transcription in pancreatic islet β -cells. *J Biol Chem* , 275:25681–89.
22. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* , 38:49-53.
23. Bootman MD, Fearnley C, Smyrnias I, MacDonald F, Roderick HL. (2009). An update on nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* , 122:2337-50.
24. Bowlus CL, McQuillan JJ, Dean DC. (1991). Characterization of three different elements in the 50-flanking region of the fibronectin gene which mediate a transcriptional response to cAMP. *J of Biol Chem* , 266:1122-7.
25. Briaud I, Lingohr MK, Dickson L, Wrede C, Rhodes CJ. (2003). Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70S6K by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* , 52:974–83.
26. Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gan- non M, Knobel SM, Piston DW, Wright CV, Powers AC. (2002). Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* , 277:11225-32.
27. Brun T, Roche E, Kim KH, Prentki M. (1993). Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic β -cell line (INS-1). *J Biol Chem* , 268:18905–11.
28. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascanos M, Yee JK. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very

-
- high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* , 90:8033-37.
29. Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metabol* , 19:300-7.
 30. Chen L & Sokabe M. (2005). Presynaptic modulation of synaptic transmission by pregnenolone sulfate as studied by Optical Recordings. *J Neurophysiol* , 94:4131-44.
 31. Chen L, Cai W, Zhou R, Furuya K, Sokabe M. (2010). Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus* , 20:499–512.
 32. Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, Mori N, Sokabe M. (2007). PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB signaling. *J Neurophysiol* , 98:1538–48.
 33. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* , 54:541–52.
 34. Choi KC , Lee YS , Lim S , Choi HK , Lee CH , Lee EK , Hong S , Kim IH , Kim SJ , Park SH. (2006). Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nat Immunol* , 7:1057–65.
 35. Choi KJ, Cho DS, Kim JY, Kim BJ, Lee KM, Kim SH, Kim DK, Kim SH, Park HS. (2011). Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release from Internal Stores in INS-1 Rat Insulinoma Cells. *Korean J Physiol Pharmacol* , 15:53-59 .
 36. Christy B & Nathans D. (1989). DNA binding site of the growth actor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci* , 86:8737-41
 37. Clapham DE. (2007). Calcium signaling. *Cell* , 131:1047–58.
 38. Cohen DR, Ferreira CP, Grentz R, Franza BR, Jr., Curran T. (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with jun: Transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev* , 3:173–84.
 39. Cook DL & Hales CN. (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B cells. *Nature* , 311:271-73.
 40. Costello P, Nicolas R, Willoughby J, Wasyluk B, Nordheim A, Treisman R. (2010). Ternary complex factors SAP-1 and Elk-1, but not net, are functionally equivalent in thymocyte development. *J Immunol* , 185:1082–92.
 41. Cruzalegui FH, Hardingham GE, Bading H. (1999). c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J* , 18:1335–44.
 42. Curran T & Franza BR, Jr. (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell* , 55:395–97.
 43. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* , 17:4426-41.
-

-
44. Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. (2001). Signaling to the nucleus by a L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* , 294:333–39.
 45. Duan L & Cobb MH. (2010). Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback. *Proc Natl Acad Sci USA* , 107:22314–19.
 46. Eckert B, Schwaninger M, Knepel W. (1996). Calcium-mobilizing insulin secretagogues stimulate transcription that is directed by the cyclic adenosine 3'5'-monophosphate/calcium response element in a pancreatic islet beta-cell line. *Endocrinology* , 137:225–33.
 47. Eder A & Bading H. (2007). Calcium signals can freely cross the nuclear envelope in hippocampal neurons: somatic calcium increases generate nuclear calcium transients. *BMC Neurosci* , 8:57.
 48. Efrat S, Fusco-DeMane D, Lemberg H, al Emran O, Wang X. (1995). Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci* , 92:3576–80.
 49. Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel J-C, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. (2006). Conditional and specific NF- κ B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *103:5072–77*.
 50. Eto K, Kaur V, Thomas MK. (2007). Regulation of Pancreas Duodenum Homeobox-1 Expression by Early Growth Response-1. *J Biol Chem* , 282:5973–83.
 51. Frödin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB, Van Obberghen EV. (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting b-cell line. *J Biol Chem* , 270:7882–89.
 52. Garnett KE, Chapman P, Chambers JA, Waddell ID, Boam DS. (2005). Differential gene expression between Zucker Fatty rats and Zucker Diabetic Fatty rats: a potential role for the immediate-early gene Egr-1 in regulation of beta cell proliferation. *J Mol Endocrinol* , 35:13-25.
 53. Gerasimenko O & Gerasimenko J. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* , 117:3087–94.
 54. Gilley R, March HN, Cook SJ. (2009). ERK1/2, but not ERK5, is necessary and sufficient for phosphorylation and activation of c-Fos. *Cell Signal* , 21:969–77.
 55. Glauser DA & Schlegel W. (2007). Sequential actions of ERK1/2 on the AP-1 transcription factor allow temporal integration of metabolic signals in pancreatic β cells. *FASEB J* , 21:3240–49.
 56. Glauser DA, Brun T, Gauthier BR, Schlegel W. (2006). Transcriptional response of pancreatic beta cells to metabolic stimulation: Large scale identification of immediate-early and secondary response genes. *BMC Mol Biol* , 8:54.
 57. Gómez-Sintes R, Hernández F, Bortolozzi A, Artigas F, Aila J, Zaratin P, Gotteland JP, Lucas JJ. (2007). Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J* , 26:2743-54.
-

-
58. Gonzalez JM, Navarro-Puche A, Casar B, Crespo P, Andres V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol* , 183:653-66.
 59. Goodison S, Kenna S, Ashcroft SJ . (1992). Control of insulin gene expression by glucose. *J Biochem* , 285:563-68.
 60. Gossen M & Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclin-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* , 89:5547-51.
 61. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* , 43:725-30.
 62. Gromada J & Dissing S. (1996). Membrane potential and cytosolic free calcium levels modulate acetylcholine-induced inositol phosphate production in insulin-secreting BTC3 cells. *Biochim Biophys Acta* , 1310:145-48.
 63. Gupta P & Prywes R. (2002). ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression. *J Biol Chem* , 277:50550-56.
 64. Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* , 4:261-67.
 65. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* , 385:260-65.
 66. Heit JJ, Apelqvist ÅA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, Kim SK. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *443:345-49*.
 67. Hige T, Fujiyoshi Y, Takahashi T. (2006). Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats. *Eur J Neurosci* , 24:1955-66.
 68. Hiriart M & Aguilar-Bryan L. (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 295:E1298-E1306.
 69. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. (1998). Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 . *J Biol Chem* , 273:31327-36.
 70. Honoré B. (2009). The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays* , 31:262-77.
 71. Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2006). Subtype-dependence of N-methyl-d-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* , 137:93-102.
 72. <http://2008.igem.org/wiki/images/4/46/QuikChange.jpg>. (Stand 2011).
 73. <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2007/2348/>. (Stand 2011).
-

-
-
74. <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>.(Stand 2011).
 75. http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html. (Stand 2011).
 76. http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi. (Stand 2011).
 77. Hussain MA, Porras DL, Rowe MH, West JR, Song WJ, Schreiber WE, Wondisford FE. (2006). Increased pancreatic beta-cell proliferation mediated by CREB binding protein gene activation. *Mol Cell Biol* , 26:7747-59.
 78. Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang Z-Y, Yamauchi T, Kuboki K, Meier M, Rhodes CJ, King GL. (1999). Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest* , 103:185–95.
 79. Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB- dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* , 21:869-83.
 80. Inada A, Hamamoto Y, Tsuura Y, Miyazaki J-I, Toyokuni S, Ihara Y, Nagai K, Yamada Y, Bonner-Weir S, Seino Y. (2004). Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic beta cells. *Mol and Cell Biol* , 24:2831-41.
 81. Jabs N, Franklin I, Brenner MB, Gromada J, Ferrara N, Wollheim CB, Lammert E. (2008). Reduced insulin secretion and content in VEGF-a deficient mouse pancreatic islets. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* , 116:46-49.
 82. 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.
 83. Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, et al. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* , 4: 606-09
 84. Jonsson J, Carisson L, Edlund T, Edlund H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* , 371:606–09.
 85. Josefsen K, Sorensen LR, Buschard K, Birkenbach M. (1999). Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells . *Diabetologia* , 42:195–203.
 86. Kim MS & Usachev YM. (2009). Mitochondrial Ca²⁺ cycling facilitates activation of the transcription factor NFAT in sensory neurons. *J Neurosci* , 29:12101–14.
 87. Kindmark H, Köhler M, Nilsson T, Arkhammar P, Wiechel KL, Rorsman P, Efendić S, Berggren PO. (1991). Measurements of cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in human pancreatic islets and insulinoma cells. *FEBS Lett* , 291:310–14.
 88. Koncz G, Bodor C, Kovcsdi D, Gati R, Sarmay G. (2002). BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells. *Immunol Lett* , 82:41–49.
 89. Konstantinova I & Lammert E. (2004). Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays* , 26:1069-75.
-
-

-
-
90. Kowolik CM & Yee JK. (2002). Preferential Transduction of Human Hepatocytes with Lentiviral Vectors Pseudotyped by Sendai Virus F Protein. *Mol Therapy* , 5:762–69.
 91. Kunze DL & Rampe D. (1992). Characterization of the effects of a new Ca²⁺ channel activator, FPL 64176, in GH3 cells. *Mol Pharmacol* , 42:666-70.
 92. Lawrence MC, Shao C, Duan L, McGlynn K, Cobb MH. (2008a). The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic β cells. *Acta Physiol* , 192:11–17.
 93. Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnesrt S, Chen W, Cobb MH. (2008b). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* , 18:436–42.
 94. Lee KH & Kim JR. (2009). Hepatocyte growth factor induced up-regulations of VEGF through Egr-1 in hepatocellular carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* , 26:685-92.
 95. Lee S, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrulina G, Milbrandt J. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (egr-1). *Science* , 73:1219–21.
 96. Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, Kleppisch T, Welling A. (2006). Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Ca_v1.2 calcium channel: identification of the phosphorylation sites. *J Bio Chem* , 281:25560-67.
 97. Leppä S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. (1998). Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* , 17:4404–13.
 98. Li F & Zhang ZM . (2009). Comparative identification of Ca²⁺ channel expression in INS-1 and rat pancreatic β cells. *World J Gastroenterol* , 15:3046-50.
 99. Liao Y, Shikapwashya ON, Shteyer E. (2004). Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice. *J Biol Chem* , 279:107-16.
 100. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG and Evan GI. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* , 23:1686–90.
 101. Livak KJ, Schmittgen TD, Kenneth J. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2DeltadeltaCT Method. *Methods* , 25:402-08.
 102. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* , 295:868-72.
 103. Mayer SI & Thiel G. (2009). Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur J Cell Biol* , 88:19–33.
 104. Mayer SI, Deixheimer V, Nishida E, Kitajima S, Thiel G. (2008a). Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation. *Endocrinol* , 149:6311–25.
-
-

-
-
105. Mayer SI, Willars GB, Nishida E, Thiel G. (2008b). Elk-1, CREB, and MKP-1 regulate Egr-1 expression in gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotrophs. *J Cell Biochem* , 105:1267-78.
 106. Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Takeshi E, Thiel G. (2011). Signal transduction of pregnenolon sulfate in insulinoma cells: Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK and ternary complex factors. *J Biol Chem* , 286:10084-96.
 107. Mayer SI, Rössler OG, Endo T, Charnay P, Thiel G. (2009). Epidermal growth factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors. *J Cell Sci* , 122:3340–50.
 108. McMahon M. (2001). Steroid receptor fusion proteins for conditional activation of Raf-MEK-ERK signaling pathway. *Methods Enzymol* , 332:401–17.
 109. McMahon SB & Monroe JG. (1996). The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response. *J Leukoc Bio* , 60:159-66
 110. Meldolesi J & Pozzan T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* , 23:10–14.
 111. Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. (1993). Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* , 90:3865–69.
 112. Mori K, Obara Y, Hirota M, Azmi Y, Kinugasa S, Inatomi S, Nakhata N. (2008). Nerve growth factor-inducing activity of *Hericium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biol Pharm Bull* , 31:1727-32
 113. Müller I, Endo T, Thiel G. (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* , 110:1481–94.
 114. Müller I, Mayer SI, Keim A, Thiel G. (2009). Lentiviraler Gentransfer: Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *BIOSpektrum* , 15:52-53.
 115. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* , 272:263-67.
 116. Namkung Y, Skrypnik N, Jeong MJ, Lee T, Lee MS, Kim HL, Chin H, Suh PG, Kim SS, Shin HS. (2001). Requirement for the L-type Ca²⁺ channel α 1D subunit in postnatal pancreatic β -cell generation. *J Clin Invest* , 108:1015–22.
 117. Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano M, Mori E, Kurosaki T, Inoue R, Hikida M, Putney JW, Jr, Mori Y. (2010). Ca²⁺ influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC β and ERK activation in B cells. *J Cell Sci* , 123:927-38.
 118. Ohsugi M, Cras-Méneur C, Zhou Y, Warren W, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. (2004). Glucose and insulin treatment of insulinoma cells results in transcriptional regulation of a common set of genes. *Diabetes* , 53:1496–1508.
 119. Olsen SR & Uhler MD. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of camp-dependent protein kinase. *J Biol Chem* , 266:11158–62.
-
-

-
120. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link . *Nature Rev Mol Cell Biol* , 4:552-65 .
 121. Park KS, Wiederkehr A, Kirkpatrick C, Mattenberger Y, Martinou JC, Marchetti P, Demaurex N, Wollheim CB. (2008). Selective Actions of Mitochondrial Fission/Fusion Genes on Metabolism-Secretion Coupling in Insulin-releasing Cells. *283:33347-56*.
 122. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* , 130:1459-66.
 123. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. (1993). Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc Natl Acad Sci* , 90:8392-96.
 124. Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy MR. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* , 8:1798-1806 .
 125. Pust T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, Berchtold MW, Hoek JB, Karpen SJ, Nathanson MH, Bennett AM. (2002). Epidermal growth factor- mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* , 277:27517–27.
 126. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* , 16:1247–55.
 127. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, London NJ, Socci C, Alejandro R. (1990). Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* , 27:185-95.
 128. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, Cheng YC, Bennett AM, Nathanson MH. (2007). Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* , 282:17061–68.
 129. Rössler OG & Thiel G. (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* , 10:40.
 130. Rössler OG, Stefano L, Bauer I, Thiel G. (2006). Stimulus-transcription coupling in the nervous system –the zinc finger protein Egr-1. *Transcription factors in the nervous system* Development, Brain Function and Disease (ed. G. Thiel) , 379-395.
 131. Rössler OG, Henß I, Thiel G. (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* , 470:93-102.
 132. Sanchez AP & Sharma K. (2009). Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Rev Mol Med* , 11:e13.
 133. Satin LS. (2000). Localized calcium influx in pancreatic beta-cells: its significance for Ca²⁺-dependent insulin secretion from the islets of Langerhans. *Endocrine* , 13:251–62.
-

-
-
134. 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.
 135. Shenoy AR & Visweswariah SS. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal Biochem* , 319:335-36.
 136. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart Kupperschmitt A, Charneau P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* , 96:4103-10.
 137. Smith CL & Hager GL. (1997). Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. *J Biol Chem* , 272:27493–96.
 138. Spohn D, Rössler OG, Philipp SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, Hoth M, Thiel G. (2010). Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase. *Mol Pharma* , 78:865-76.
 139. Stefano L, Al Sarraj J, Rössler OG, Vinson C, Thiel G. (2006). Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *J Neurochem* , 97:92–104.
 140. Steinmüller L & Thiel G. (2003). Regulation of Gene Transcription by a Constitutively Active Mutant of Activating Transcription Factor 2 (ATF2) Lars Steinmüller and Gerald Thiel. *Biol Chem* , 384:667–72.
 141. Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C, Thiel G. (2001). Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J* , 360:599–607.
 142. Sugimoto T, Stewart S, Guan KL. (1997). The calcium/calmodulin- dependent protein phosphatase, Calcineurin, is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* , 272:29415–18.
 143. Sukhatme VP, Cao X, Chang L, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira P, Cohen D, Edwards S, Shows T, Curran T, Le-Beau M, Adamson ED. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation. *Cell* , 53:37-43.
 144. Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W. (1998). Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic β (INS-1) cells. *FASEB J* , 12:1173-82.
 145. Takahashi H, Asano K, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Wuepper K D, Iizuka H. (1998). Structure and transcriptional regulation of the human cystatin A gene. The 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) responsive element-2 site (–272 to –278) on cystatin A gene. *J Biol Chem* , 273:17375–80.
 146. Tashjian AH, Bancroft FC, Jr, Levine L. (1970). Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol* , 47:61-70.
-
-

-
-
147. Thiel G & Cibelli G. (1999). Corticotropin-releasing factor and vasoactive intestinal polypeptide activate gene transcription through the cAMP signaling pathway in a catecholaminergic immortalized neuron. *Neurochem Int* , 34:183-91.
 148. Thiel G & Cibelli G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* , 193:287-92.
 149. Thiel G & Rössler OG. (2005). Signaltransduktion Rezeptor-Tyrosinkinasen und intrazelluläre Signalkaskaden:Signaltransduktion. *Biol Unserer Zeit* , 35:312-19.
 150. Thiel G & Rössler OG. (2007). Viren als Werkzeuge der Gentherapie: Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht. *Biol Unserer Zeit* , 37:241-48.
 151. Thiel G, Al Sarraj J, Vinson C, Stefano L, Bach K. (2005). Role of basic region leucine zipper transcription factors cyclic AMP response element binding protein (CREB), CREB2, activating transcription factor 2 and CAAT/enhancer binding protein alpha in cyclic AMP response element-mediated transcription. *J Neurochem* , 92:321-36.
 152. Thiel G, Ekici M, Rössler OG. (2009). Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf. *Cell Commun Signal* , 7:8.
 153. Thiel G, Lietz M, Cramer M . (1998). Biological activity and modular structure of RE-1 silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes . *J Biol Chem* , 273:26891-99.
 154. Thiel G, Mayer SI, Müller I, Stefano L, Rösler O. (2010). Egr-1- A Ca²⁺-regulated transcription factor. *Cell Calcium* , 47:397-403.
 155. Tian J & Karin M. (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* , 274:15173-80.
 156. Tourtellotte WG, Nagarajan R, Bartke A, Milbrandt J. (2000). Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis. *Mol Cell Biol* , 20:5261-68.
 157. Trus M, Corkey RF, Neshler R, Richard AMT, Deeney JT, Corkey BE, Atlas D. (2007). The L-type voltage-gated Ca²⁺ channel is the Ca²⁺ sensor protein of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Biochem* , 46:14461-67.
 158. Van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* , 14:1798-1811.
 159. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. (2000). Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* , 275:31555-58.
 160. Verma IM. (1996). "Green light" for gene transfer. *Nat Biotechnol* , 14:576.
 161. Vignali S, Leiss V, Karl R, Hofmann F, Welling A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *J Physiol* , 572:691-706.
 162. Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M. (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* , 22:6321-35.
-
-

-
-
163. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* , 70:482-94.
 164. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. (1996). Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* , 10:1327–34.
 165. Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells . *10:1421-30*.
 166. Walsh P, Metzger D, Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech* , 10:506-13.
 167. Wang Q, Cai K, Pang S, Wang T, Qi D, Zhu Q, Ni Z, Le Y. (2008). Mechanisms of glucose-induced expression of pancreatic-derived factor in pancreatic β -cells. *Endocrinology* , 149:672–80.
 168. Whitmarsh AJ, Yang S-H, Su MS-S, Sharrocks AD, Davis RD. (1997). Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* , 17:2360–71.
 169. Wolheim CB & Biden TJ. (1986). Signal transduction in insulin secretion: comparison between fuel stimuli and receptor agonists. *Ann NY Acad Sci* , 488:317-33.
 170. Wu X & Bers DM. (2006). Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca^{2+} store throughout cardiac myocyte. *Circ Res* , 99:283–91.
 171. Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, Ma C, Thiel G, Li M. (2011). Egr-1 Transactivates Bim Gene Expression to Promote Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* , 31:5032-44.
 172. Yamagishi S, Yamada M, Ishikawa Y, Matsumoto T, Ikeuchi T, Hatanaka H. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase regulated low potassium- induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* , 276:5129–33.
 173. Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Zou YS, Mackman N, Pinsky D, Stern DM. (2000). Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med* , 6:1355-61.
 174. Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA. (1997). Target disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci* , 94:300.
 175. Yang M, Chisholm JW, Soelaiman S, Shryock JC. (2010). Sulfonylureas uncouple glucose-dependence for GPR40-mediated enhancement of insulin secretion from INS-1E cells. *Mol Cell Endocrinol* , 315:308-13.
 176. Yang S-H, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a MAP kinase targeting motif. *Mol Cell Biol* , 18:710–20.
-
-

-
-
177. Yasuda K, Yamada Y, Inagaki N, Yano H, Okamoto Y, Tsuji K, Fukumoto H, Imura H, Seino S, Seino Y. (1992). Expression of GLUT1 and GLUT2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes* , 41:76–81.
 178. Yokoyama T, Takano K, Yoshida A, Katada F, Sun P, Takenawa T, Andoh T, Endo T. (2007). DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *J Cell Biol* , 177:781–93.
 179. Zanke BW, Rubie EA, Winnett E, Chan J, Randall S, Parsons M, Boudreau K, McInnis M, Yan M, Templeton DJ, Woodgett JR. (1996). Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes . *J Biol Chem* , 271:29876–81.
 180. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA and Montminy M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* , 102:59–64.
 181. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TD. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virology* , 73:2886–92.

8 Publikationen und Poster

Publikationen

1. Keim A, Müller I, Thiel G. (2011) Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *submitted*
2. Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Takeshi E, Thiel G. (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage gated calcium channels, ERK and ternary complex factors. *J Cell Biochem* , 286:10084-96.
3. Meng R, Al-Quobaili F, Müller I, Götz C, Thiel G, Montenarh M. (2010). CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci* , 67: 2481-2489
4. Müller I, Mayer SI, Keim A, Thiel G. (2009). Lentiviraler Gentransfer: Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *BIOSpektrum* , 15:52-53
5. Müller I, Endo T, Thiel G. (2010) Regulation of AP-1 activity in Glukose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* , 110:1481–1494
6. Müller I, Rössler OG, Thiel G. (2011). Pregnenolone Sulfate Activates Basic Region Leucine Zipper Transcription Factors in Insulinoma Cells - Role of Voltage Gated Ca²⁺ Channels and Transient Receptor Potential TRPM3 Channels. *Mol Pharma* , doi:10.1124/mol.111.074781 MOL #74781.
7. Müller I & Thiel G. (2011). Role of calcium microdomains in regulating glucose-induced gene transcription in insulinoma cells. *submitted*
8. Müller I, Rössler OG, Wittig C, Menger MD, Thiel G. (2011) Critical role of Egr transcription factors in regulating insulin biosynthesis, blood glucose homeostasis, and proliferation of pancreatic β -cells. *submitted*
9. Thiel G, Mayer SI, Müller I, Stefano L, Rösler OG. (2010). Egr-1- A Ca²⁺-regulated transcription factor. *Cell Calcium* , 47:397-403.

Poster

- Müller I, Thiel G
Regulation of AP-1 activity in Glukose-stimulated insulinoma cells.
61. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie E. V., Mosbach/Baden, April 8-10, 2010.
- Mayer SI, Müller I, Thiel G
Signaltransduction of pregnenolone sulfat in insulinoma cells.
61. Mosbacher Kolloquium der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie E. V., Mosbach/Baden, April 8-10, 2010.

- Müller I, Thiel G
Major role of voltage-gated Ca^{2+} channels, elevated cytoplasmic Ca^{2+} concentrations in Glukose-induced transcriptional regulation of insulinoma cells.
34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie,
Bonn, März 30- April 02, 2011.
- Mayer SI, Müller I, Thiel G
Signaltransduction of pregnenolone sulfat in insulinoma cells.
34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie,
Bonn, März 30- April 02, 2011.

9 Danksagung

Zum Schluss ein herzliches Dankeschön an ...

... Herrn Prof. Dr. Gerald Thiel für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, die Förderung und das Lesen des Manuskriptes.

... Herrn Prof. Dr. Schmitz, der sich freundlicherweise sofort bereit erklärte, die Zweitkorrektur zu übernehmen.

... Dr. Oliver Rößler für die sachkundigen Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft.

... meine Arbeitskolleginnen Anja, Anke, Andrea und Iris für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

... Karl für die Teilung seines Schreibtisches, die stete Zuarbeit und Hilfe.

... der AG Montenarh und AG Menger danke ich für die freundliche Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich bei Christine Wittig, die unermüdlich bereit war, jegliche Fragestellungen anzugehen.

... meine Freunde für ihre Freundschaft, Aufmunterung und Verständnis und geteilte Freude.

... meine Eltern für all die Liebe, die Unterstützung und den Glauben an mich.

... Achim, der bedingungslos Geduld und Verständnis für alles hatte.

Danke für die schöne Zeit.

... ohne Euch hätte mir die Arbeit lange nicht so viel Freude bereitet.