

Aus der Fachrichtung für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Einfluss der Proteinkinase CK2 auf die Glucagon-Expression
der Alpha Zellen des Pankreas**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2024

vorgelegt von

M. Sc. Mandy Pack

geb. am 31.03.1993 in Saarlouis

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet, mit tief empfundener Dankbarkeit
für ihre Liebe und Unterstützung.

Datum: 20.05.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Götz

Prof. Dr. Jörn Schattenberg

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Summary.....	6
3. Einleitung	7
3.1 Die Glukosehomöostase	7
3.2 Die Proteinkinase CK2	10
3.3 Der Einfluss der Proteinkinase CK2 auf den Transkriptionsfaktor PDX1	12
4. Zielsetzung.....	14
5. Material	15
5.1 Abkürzungsverzeichnis	15
5.2 Zelllinien	17
5.3 Plasmide	18
5.4 Antikörper.....	18
5.4.1 Primär-Antikörper	18
5.4.2 Sekundär-Antikörper.....	18
5.4.3 Primer /Primersequenzen	19
5.5 Chemikalien und Enzyme	19
5.5.1 Chemikalien.....	19
5.5.2 Geräte	20
5.6 Kulturmedien und Zusätze	21
5.6.1 Medien	21
5.6.2 Puffer und Lösungen	22
5.6.3 Material	23
5.6.4 Software	25
5.6.5 Protein- Molekulargewichtsmarker.....	25
6. Methoden.....	26
6.2 Zellen.....	26
6.2.1 Kultivierung von Zellen	26
6.2.2 Knockout-Zelllinien	26
6.2.3 Auftauen von Zellen.....	27
6.2.4 Kryokonservierung von Zellen	27
6.2.5 Splitten von Zellen	28
6.2.6 CK2 Inhibitoren: CX-4945 und SGC-CK2-1	28
6.2.7 Bestimmung der Zellzahl	28
6.2.8 Water soluble Tetrazolinium (WST) - Assay	29
6.2.9 Lactat-Dehydrogenase (LDH) - Assay	29

Inhaltsverzeichnis

6.2.10 Wachstumskurve	30
6.2.11 Transiente Transfektion von Zellen	30
6.2.12 Luciferase-Reporter-Assay	31
6.2.13 Proteinextraktion.....	32
6.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
6.2.15 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	33
6.2.16 Western Blot.....	34
6.2.17 Antikörper	34
6.2.18 Auswertung Western Blot	35
6.2.19 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation.....	35
6.2.20 Reverse Transkription.....	36
6.2.21 quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).....	37
6.2.22 Zytoplasma-Kernfraktionierung.....	39
6.2.23 Streptavidin-Agarose Pull-Down-Assay	40
6.2.24 Generierung von Pseudoinsele (PI).....	41
6.2.25 Einbetten generierter Pseudoinsele (PI) in eine HepatoQuick®-Matrix	41
6.2.26 Immunhistochemische Analysen.....	42
6.3 Experimente im Maus-Modell	42
6.3.1 Versuchstiere.....	42
6.3.2 Entnahme des Pankreas aus Mäusen und Isolation von pankreatischen Inseln ...	43
6.3.3 Murines Nierenkapsel-Modell	45
6.3.4 Intraperitonealer Glukose Toleranz Test (IPGTT)	46
6.3.5 GCG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	46
6.3.6 Insulin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	47
6.4 Statistische Analyse	47
7. Ergebnisse	48
7.1 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Viabilität von MIN6-Zellen	48
7.2 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die CK2 Aktivität	49
7.3 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Insulinproduktion und -sekretion	51
7.4 Die Zelllinien α TC1 und MIN6 im Vergleich	54
7.5 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die CK2 Protein- und mRNA-Expression.....	55
7.6 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Proliferation und Viabilität	58
7.7 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Expression und -Sekretion	61
7.8 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Promotor Aktivität	63

7.9 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die nucleäre Expression von PAX6 und MafB	65
7.10 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die Bindung von MafB und PAX6 an den GCG-Promotor.....	67
7.11 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die nucleäre Expression von PDX1	68
7.12 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Bindung von PDX1 an den GCG-Promotor.....	70
7.13 Einfluss einer Überexpression von PDX1 auf die GCG-Expression.....	72
7.14 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Insulin- und GCG-Sekretion <i>ex vivo</i>	74
7.15 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die GCG-Sekretion von Pseudoinseln (PI)	76
7.16 Transplantation von α TC1- oder α TC1 KO-Zellen unter die Nierenkapsel	78
7.17 Einfluss einer CK2 Inhibition auf die GCG- und Insulin-Sekretion von humanen Langerhans-Inseln	81
7.18 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die Proliferation und Viabilität	84
7.19 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die CK2 Protein- und mRNA-Expression ...	86
7.20 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die GCG-Expression und -Sekretion.....	88
7.21 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die nucleäre Expression von PDX1, PAX6 und MafB	90
7.22 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die Bindung von PAX6 und MafB an den GCG-Promotor.....	92
8. Diskussion.....	94
8.1 Überprüfung des neu entwickelten CK2-Inhibitors SGC-CK2-1.....	94
8.2 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Expression in α TC1-Zellen.....	97
8.3 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die GCG-Expression in α TC1-Zellen	101
8.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	103
9. Quellen.....	107
10. Danksagung	125
11. Publikationen	126
11.1 Veröffentlichungen aus dieser Dissertation.....	126
11.2 Weitere Veröffentlichungen	126
12. Lebenslauf.....	127

1. Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase ist entscheidend für einen normalen Stoffwechsel und hängt vor allem von der regulierten Expression und Sekretion von Insulin durch die Beta-Zellen sowie von Glucagon (GCG) ab, das von den Alpha-Zellen des Pankreas produziert wird. Zahlreiche Transkriptionsfaktoren sind für die Aufrechterhaltung der Zellidentität, sowie für die Expression der antagonistisch wirkenden Hormone zuständig. Bisherige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Proteinkinase CK2, welche aus zwei katalytischen α/α' - und zwei regulatorischen β -Untereinheiten aufgebaut ist, an diesem Prozess durch aktive Phosphorylierung der Substrate und durch sekundäre Effekte, wie z.B. die Modulation von Signaltransduktionswegen, die Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen oder die Stabilisierung bestimmter Proteine, in die Regulation der Insulin-Expression eingebunden ist. Allerdings ist bis heute nur wenig über die Auswirkungen einer CK2 Inhibition auf die GCG-Expression bekannt. Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Erkenntnisse über den zugrundeliegenden Mechanismus der GCG-Expression in Alpha-Zellen nach CK2 Inhibition. In ersten Experimenten wurde untersucht, ob der neue und selektivere CK2 Inhibitor SGC-CK2-1 (SGC) die Insulin-Expression und -Sekretion ähnlich dem bereits etablierten Hemmstoff CX-4945 (CX) erhöht.

Die Experimente in MIN6-Zellen zeigten, dass sowohl SGC-CK2-1 als auch CX-4945 die CK2 hemmen und die Insulin-Expression und -Sekretion steigern. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden beide CK2-Inhibitoren für die weiteren Experimente in der Alpha-Zelllinie α TC1 verwendet. Zusätzlich wurden α TC1-Knockout (KO)-Zelllinien generiert, bei denen entweder die α - oder α' -Untereinheit mittels der CRISPR/Cas9-Methode ausgeschaltet wurde. *In vitro*-Analysen mittels Western Blot haben gezeigt, dass weder eine CK2-Inhibition noch ein Knockout der CK2 α zu einer Phosphorylierung von Akt an Serin129 führen. Die anschließenden Viabilitätsassays ergaben, dass sowohl die CK2 Inhibition als auch der Knockout der CK2 α zu einer leichten Reduktion der Proliferation und Viabilität führen. Weiterhin wurde mittels Western Blot, qRT-PCR und ELISA festgestellt, dass sowohl die CK2 Inhibition als auch der Knockout der CK2 α zu einer signifikanten Reduktion der GCG-Gen- und Protein-Expression sowie der -Sekretion führen. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde mittels Reportergen-Analysen und Pull-Down-Assays entschlüsselt. Eine

Inhibition und ein Knockout der CK2 α führt zu einer erhöhten Expression und Bindung des Transkriptionsfaktors pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) an den GCG-Promotor. Dies wiederum führt dazu, dass die aktivierenden Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB von ihren Bindungsstellen verdrängt werden. Die anschließenden *ex vivo* Experimente mit isolierten murinen pankreatischen Inseln bestätigten die Reproduzierbarkeit der *in vitro* Ergebnisse und zeigten, dass diese nur in geringem Maße von der Sekretion von Insulin beeinflusst wurden. Zur weiteren Bekräftigung der Ergebnisse, wurden Pseudoinseln (PI) aus MIN6- und α TC1-Zellen oder MIN6- und α TC1 CK2 α KO-Zellen generiert. Hier konnte gleichermaßen eine signifikant reduzierte GCG-Sekretion in PI mit α TC1 CK2 α KO-Zellen beobachtet werden. Basierend auf den *in vitro* und *ex vivo* Experimenten wurde anschließend in einem Mausmodell gezeigt, dass Mäuse, die α TC1-Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert bekamen, im Vergleich zur Transplantation von α TC1 CK2 α KO-Zellen eine Hyperglykämie nach dem Fasten aufwiesen. Die Relevanz der erzielten Ergebnisse wurde auch durch Experimente mit isolierten humanen pankreatischen Inseln bestätigt, bei denen ebenfalls mittels ELISA eine reduzierte GCG-Sekretion nachgewiesen wurde.

Die Wiederholung dieser Experimente mit der α TC1-Zelllinie welche ein Knockout der CK2 α' aufwies, zeigte eine gegenteilige Auswirkung auf die GCG-Expression und -Sekretion. Während die Ergebnisse der Viabilitätsassays keinen Unterschied aufzeigten, konnte eine signifikant erhöhte Pro-GCG-Expression nach Knockout der CK2 α' in Western Blots nachgewiesen werden. Die durchgeführten qRT-PCRs und ELISAs bestätigten, dass der Einfluss auch auf Promotorebene stattfand. Eine gesteigerte nucleäre Expression des Transkriptionsfaktors MafB führte zu einer erhöhten Bindung an den GCG-Promotor, während auch eine verstärkte Bindung von PAX6 an den Promotor festgestellt wurde.

Zusammenfassend konnten die vorliegenden Ergebnisse erstmalig den negativen Einfluss der CK2-Inhibition auf die GCG-Expression und -Sekretion bestätigen und den zugrundeliegenden Mechanismus aufklären. Diese Erkenntnisse heben die Bedeutung der CK2-Hemmung für das Verständnis der Rolle von CK2 in der Regulation der Glukosehomöostase hervor und bieten wertvolle Ansätze, um die komplexen Mechanismen der hormonellen Steuerung des Blutzuckerspiegels weiter zu entschlüsseln.

2. Summary

Maintaining glucose homeostasis is crucial for normal metabolism and depends primarily on the regulated expression and secretion of insulin by beta cells, as well as glucagon (GCG), produced by pancreatic alpha cells. Numerous transcription factors are responsible for maintaining cell identity and regulating the expression of these antagonistic hormones. Previous findings indicate that protein kinase CK2, composed of two catalytic α/α' -subunits and two regulatory β -subunits, plays a role in this process through active phosphorylation of substrates and secondary effects such as modulation of signaling pathways, influencing protein-protein interactions, and stabilizing specific proteins, thereby contributing to the regulation of insulin expression. However, the effects of CK2 inhibition on GCG expression remain poorly understood. This study provides novel insights into the underlying mechanism of GCG expression in alpha cells following CK2 inhibition. Initial experiments investigated whether the new, more selective CK2 inhibitor SGC-CK2-1 (SGC) increases insulin expression and secretion similarly to the already established inhibitor CX-4945 (CX). Experiments conducted in MIN6 cells revealed that both SGC-CK2-1 and CX-4945 inhibit CK2 and increase insulin expression and secretion. Based on these results, both CK2 inhibitors were used in further experiments with the alpha cell line α TC1. Additionally, CRISPR/Cas9 technology was employed to generate α TC1 knockout (KO) cell lines in which either the CK2 α or CK2 α' subunit was specifically deleted. Western blot analyses showed that neither CK2 inhibition nor CK2 α knockout led to phosphorylation of Akt at serine 129. Viability assays indicated that CK2 inhibition and CK2 α knockout resulted in a slight reduction in cell proliferation and viability. Furthermore, Western blot, qRT-PCR, and ELISA revealed that both CK2 inhibition and CK2 α knockout significantly reduced GCG gene and protein expression, as well as GCG secretion. The underlying mechanism was elucidated using reporter gene assays and pull-down assays. CK2 α inhibition or knockout led to increased expression and binding of the transcription factor pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) to the GCG promoter, displacing the activating transcription factors PAX6 and MafB from their binding sites. Ex vivo experiments with isolated murine pancreatic islets confirmed the reproducibility of these in vitro results, showing that these effects were only minimally influenced by insulin secretion. To reinforce these findings, pseudoislets (PI) were generated from

MIN6 and α TC1 cells or MIN6 and α TC1 CK2 α KO cells. A significant reduction in GCG secretion was observed in PI containing α TC1 CK2 α KO cells. In a mouse model, transplantation of α TC1 cells under the renal capsule led to hyperglycemia after fasting compared to transplantation of α TC1 CK2 α KO cells. The relevance of these results was confirmed using isolated human pancreatic islets, which also demonstrated reduced GCG secretion via ELISA. Repeating these experiments with α TC1 cells lacking the CK2 α' subunit revealed an opposite effect on GCG expression and secretion. While viability assays showed no difference, significantly increased pro-GCG expression was detected in Western blots after CK2 α' knockout. qRT-PCR and ELISA confirmed that the effect occurred at the promoter level, showing increased nuclear expression of the transcription factor MafB and enhanced binding of both MafB and PAX6 to the GCG promoter. In summary, this study for the first time confirmed the negative impact of CK2 inhibition on GCG expression and secretion and elucidated the underlying mechanism. These findings highlight the importance of CK2 inhibition for understanding the role of CK2 in the regulation of glucose homeostasis and provide valuable insights for further deciphering the complex mechanisms of hormonal regulation of blood glucose levels.

3. Einleitung

3.1 Die Glukosehomöostase

Die Glukosehomöostase ist ein komplexer und lebenswichtiger Prozess, der sicherstellt, dass die Blutglukosekonzentration innerhalb enger physiologischer Grenzen bleibt. Eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutglukosespiegels spielen die Pankreashormone Insulin und Glucagon, die antagonistisch wirken. Beide Hormone werden in den Langerhans-Inseln des Pankreas produziert und sezerniert. Besonders Insulin, das von den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln freigesetzt wird, hat eine entscheidende Funktion bei der Senkung des Blutglukosespiegels (Ojha et al., 2019). Das von den Beta-Zellen sezernierte Insulin zirkuliert im Blut und bindet an spezifische Insulinrezeptoren (IR) auf der Oberfläche von Zielzellen, insbesondere von Muskel- und Fettzellen. Dies aktiviert eine Kaskade von Signalwegen, die die

Translokation von Glukosetransporter (GLUT)4-Vesikeln zur Zellmembran fördern. Sobald die GLUT4-Transporter in die Zellmembran eingebaut sind, können sie Glukose aus dem Blut in die Zelle transportieren (Bader et al., 1992; James et al., 1989; Mueckler, 2001). Im Gegensatz dazu, ist das Hauptzielorgan von GCG, welches von den Alpha-Zellen des Pankreas produziert und sezerniert wird, die Leber. Bei niedrigen Blutglukosespiegeln wird GCG von den Alpha-Zellen freigesetzt und bindet an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Leberzellen. Diese Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die bei Aktivierung eine Signaltransduktionskaskade auslösen, die durch das Enzym Adenylatcyclase vermittelt wird. Dies bewirkt einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, wodurch die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird. Die aktivierte PKA phosphoryliert verschiedene Enzyme, die die Stoffwechselprozesse der Glykogenolyse und Gluconeogenese steuern. Hier fördert die Glykogenolyse den Abbau von Glykogen zu Glukose. Dies geschieht durch die Aktivierung von Glykogen-Phosphorylase, einem Enzym, das Glykogen in Glukose-1-phosphat umwandelt, welches anschließend in Glukose-6-phosphat und schließlich in freie Glukose umgewandelt wird. Die Glukose wird dann in den Blutkreislauf freigesetzt, um den Blutglukosespiegel zu erhöhen (Armour et al., 2023; Lv et al., 2017; Morris, 2018; Ramnanan et al., 2011; Winther-Sørensen et al., 2020; Zeigerer et al., 2021; Zmazek et al., 2021). Gleichzeitig wird die Glykolyse, der Abbau von Glukose zur Energiegewinnung, gehemmt. Dies wird durch die Hemmung von Schlüsselenzymen der Glykolyse wie Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) und Pyruvatkinase erreicht. Die Hemmung dieser Enzyme reduziert den Glukoseverbrauch in der Leber, sodass mehr Glukose in den Blutkreislauf freigesetzt werden kann (Okar et al., 2001; Paredes-Flores & Mohiuddin, 2020; Rider et al., 2004; Rui, 2014). Die Identität der Alpha- und Beta-Zellen im Pankreas ist daher entscheidend für ihre spezialisierten Funktionen im endokrinen System. Alpha-Zellen sind für die Produktion und Freisetzung von Glucagon verantwortlich, während Beta-Zellen Insulin synthetisieren und sekretieren. Ein tieferes Verständnis der Entwicklung dieser Zelltypen ergibt sich aus der Ontogenese, die hauptsächlich an Mäusen untersucht wurde. Dabei differenzieren sich endokrine Vorläuferzellen im Gangepithel und beginnen, je nach zukünftigem Zelltyp, die Transkriptionsfaktoren ARX oder PAX4 zu exprimieren (Collombat et al., 2003).

Diese gezielte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist ausschlaggebend, da sie die

spätere Spezialisierung und Funktion der Zellen steuert. Viele Transkriptionsfaktoren, die während der Ontogenese der pankreatischen Zellen aktiv sind, können auch nach der Reifung der Zellen weiterhin als Regulatoren fungieren. So beruht die regulierte Expression von Insulin und Glucagon auf der Aktivität zentraler Transkriptionsfaktoren wie PDX1, PAX6 und MafB, die maßgeblich die Differenzierung und die Identität der adulten Zellen am Promotor beeinflussen (Kato et al., 2018; St-Onge et al., 1997; Zhu et al., 2017). Der GCG-Promotor wurde umfassend untersucht und besteht aus fünf Kontrollelementen (G1-G5). Dabei bilden die Elemente G2, G3 und G5 die Enhancer-Region während G1 und G4 den Minimal-Promotor darstellen (Gosmain et al., 2011; Leung-Theung-Long et al., 2005). PAX6 kann sowohl am G3-, als auch am G1-Element des Promotors binden. Ritz-Laser et al. zeigten, dass die Paired-Domäne von PAX6 alleine ausreicht, um an das G3-Element zu binden. Für die Interaktion mit dem G1-Element des Promotors sind jedoch sowohl die Paired-Domäne als auch die Homöodomäne erforderlich. Darüber hinaus bindet PAX6 bevorzugt als Monomer an das G1-Element, kann jedoch auch als Heterodimer mit MafB interagieren (Gosmain et al., 2007; Ritz-Laser et al., 1999).

Durch die antagonistische Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren kann die Identität dieser Zellen jedoch gestört werden, was ihre Funktion und die Homöostase des Glukosestoffwechsels beeinträchtigen könnte. In diesem Zusammenhang konnten Ritz-Laser et al. zeigen, dass eine ektopische Expression des Beta-zell-spezifischen Transkriptionsfaktors PDX1 die GCG-Expression negativ beeinflusst (Ritz-Laser et al., 2003). Sie vermuteten, dass PDX1 die Genexpression durch Protein-Protein-Interaktionen inhibieren könnte.

Die biologische Funktion von PDX1 wird durch posttranslationale Modifikationen, insbesondere durch Phosphorylierung, fein reguliert. Verschiedene Kinasen spielen dabei eine zentrale Rolle und beeinflussen die Aktivität und Stabilität von PDX1. Dazu gehören Mammalian sterile 20-like kinase (MST)1 und Glykogensynthase-Kinase (GSK)3, die durch Phosphorylierung die Funktion von PDX1 entweder hemmen oder modulieren. MST1 phosphoryliert PDX1 an spezifischen Stellen und hemmt dadurch seine Aktivität, was zu einer reduzierten Insulinproduktion in den Beta-Zellen führen kann. GSK3 wirkt ebenfalls auf PDX1, allerdings auf andere Phosphorylierungsstellen, und kann so dessen Stabilität beeinflussen (Yin et al., 2023, Humphrey et al., 2009). Ein weiterer wichtiger Regulator ist die CK2, die durch zusätzliche Phosphorylierung

die Funktion und Stabilität von PDX1 weiter moduliert und somit nicht nur die Insulinregulation, sondern auch die generelle Funktionalität der Beta-Zellen fein abstimmt (Klein et al., 2017). Solche Modifikationen ermöglichen es, die Aktivität von PDX1 dynamisch an die wechselnden metabolischen Anforderungen des Körpers anzupassen und dadurch sowohl die Insulinsekretion als auch die zelluläre Homöostase präzise zu kontrollieren.

3.2 Die Proteinkinase CK2

Die CK2, welche früher irrtümlicherweise als Casein Kinase 2 benannt wurde, ist ein essentielles und ubiquitär exprimiertes Enzym, das in vielen Spezies hoch konserviert ist und eine zentrale Rolle in der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse spielt. Die Proteinkinase CK2 ist Serin-, Threonin- und Tyrosin-spezifisch und zeichnet sich durch ihre Fähigkeit aus, mehr als 700 verschiedene Substrate zu phosphorylieren. Dabei phosphoryliert CK2 bevorzugt Serin- oder Threoninreste in einer sauren Umgebung, wobei eine spezifische Konsensussequenz erforderlich ist. Diese Sequenz folgt dem Muster S/T-x-x-D/E, wobei „S/T“ für Serin oder Threonin steht, „x“ eine beliebige Aminosäure darstellt und „D/E“ für die sauren Aminosäuren Aspartat oder Glutamat (Cesaro et al., 2023; Marin et al., 1994; Meggio & Pinna, 2003).

Die CK2 besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (α/α') und zwei regulatorischen Untereinheiten (β), die ein tetrameres Holoenzym bilden. Diese katalytischen Untereinheiten sind für die Phosphorylierung von Zielproteinen verantwortlich, während die regulatorischen Untereinheiten die Aktivität und Stabilität des Enzyms modulieren können (Chon et al., 2015; D'Amore et al., 2020; D. S. Lee et al., 2022; Marschke et al., 2011; Pierre et al., 2011; Siddiqui-Jain et al., 2010; Tang et al., 2020). Neben den monomeren Untereinheiten können diese auch Tetramere und höhermolekulare Oligomere bilden. Diese Oligomere sind symmetrisch aufgebaut und können eine Rolle bei der Regulation der Aktivität der CK2 in der Zelle spielen (Lolli et al., 2012). Die CK2 greift nicht nur in Prozesse der embryonalen Entwicklung ein, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle in anderen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Angiogenese sowie der Seneszenz (Ahmad et al., 2008; Hanna et al., 1995; Kalathur et al., 2015; Litchfield & Lüscher,

1993; Montenarh, 2010; Pinna & Meggio, 1997; Schuster et al., 1999; Yde et al., 2008). In der Krebsforschung wird intensiv die Funktion der CK2 als anti-apoptotische Kinase in vielen Tumorzellen untersucht. Hier spielt sie eine bedeutende Rolle bei der Förderung der malignen Zelltransformation, indem sie Mechanismen unterstützt, die die Viabilität und Proliferation von Tumorzellen begünstigen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird intensiv daran gearbeitet, die CK2 mittels pharmakologischer Hemmstoffe zu inhibieren, um so die Zellproliferation und das Tumorwachstum zu unterbinden (Chua et al., 2017; Cozza & Pinna, 2016; Guerra & Issinger, 2008; Halloran et al., 2022; Trembley et al., 2009; G. Wang et al., 2005; Zheng et al., 2013). In diesem Zusammenhang wächst die Liste der CK2 Inhibitoren kontinuierlich, wobei die Mehrheit dieser Inhibitoren ATP-kompetitiv ist (Sarno et al., 2005). CX-4945, auch bekannt als Silmitasertib, gilt als einer der am besten untersuchten CK2 Inhibitoren in der aktuellen Tumorforschung. Obwohl bereits zahlreiche CK2 Inhibitoren in der Literatur beschrieben wurden, war CX-4945 der erste, der in klinische Studien zur Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren beim Menschen aufgenommen wurde (Chon et al., 2015; D'Amore et al., 2020; D. S. Lee et al., 2022; Marschke et al., 2011; Pierre et al., 2011; Siddiqui-Jain et al., 2010; Tang et al., 2020). Weitere Studien zeigten jedoch, dass CX-4945 alternatives Splicing durch Modulation der Serin/Arginin-reichen (SR)-Phosphorylierung reguliert, indem es die Cdc2-like Kinasen (CLK) in einer ATP-kompetitiven Weise gezielt hemmt (H. Kim et al., 2014; J. Y. Lee et al., 2019). Zudem zeigt CX-4945 einen CK2-unabhängigen Einfluss auf die Kinasen Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) und Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β). Der Inhibitor begrenzt die DYRK1A- und GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung von Cyclin D1 und reduziert die durch die Kinase vermittelte Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)-Signalgebung in der Zelle (Cozza et al., 2013; Gowda et al., 2017; Grygier et al., 2023). Aufgrund der fortbestehenden Off-Target-Effekte der derzeit verwendeten CK2 Inhibitoren ist die Erforschung noch spezifischerer Inhibitoren ein bedeutender Schwerpunkt der aktuellen Forschung. Die Arbeitsgruppe Wells et al. veröffentlichte kürzlich den neuen und selektiveren CK2 Inhibitor SGC-CK2-1, der entgegen den Erwartungen keine signifikante antiproliferative Aktivität aufweist. Gleichzeitig zeigte sich eine starke Hemmung der Protein-Kinase-Aktivität der CK2, was durch eine gestörte Phosphorylierung von Akt an Serin129 deutlich wurde (Di Maira et al., 2005). Da

vergleichbare Störungen der Akt-Signalübertragung auch bei anderen CK2 Inhibitoren dokumentiert wurden, belegen diese Ergebnisse einen Einfluss auf die nachgeschaltete Signaltransduktion von CK2 (Wells et al., 2021)., während die regulatorischen Untereinheiten die Aktivität und Stabilität des Enzyms modulieren können (Bibby & Litchfield, 2005; Cochet & Chambazt, 1983; Filhol et al., 2004; Katoh & Kubo, 1983). Neben den monomeren Untereinheiten können diese auch als Tetramere und höhermolekulare Oligomere vorliegen. Diese Oligomere sind symmetrisch aufgebaut und spielen vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Aktivität der CK2 in der Zelle spielen (Lolli et al., 2012).

In der Krebsforschung wird intensiv die Funktion der CK2 als anti-apoptotische Kinase in vielen Tumorzellen untersucht. Hier spielt sie eine bedeutende Rolle bei der Förderung der malignen Zelltransformation, indem sie Mechanismen unterstützt, die die Viabilität und Proliferation von Tumorzellen begünstigen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird intensiv daran gearbeitet, die CK2 mittels pharmakologischer Hemmstoffe zu inhibieren, um die Zellproliferation und das Tumorstadium zu unterbinden (Chua et al., 2017; Cozza & Pinna, 2016; Guerra & Issinger, 2008; Halloran et al., 2022; Trembley et al., 2009; Wang et al., 2005; Zheng et al., 2013).

3.3 Der Einfluss der Proteinkinase CK2 auf den Transkriptionsfaktor PDX1

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich auch die Bedeutung der CK2 für die Regulation des Glukosestoffwechsels herausgestellt. Ein maßgebliches Beispiel ist die Interaktion der CK2 mit Transkriptionsfaktoren wie PDX1. Die CK2 phosphoryliert PDX1 an Threonin²³¹ und Serin²³². Diese Phosphorylierung führt zu einer verminderten Stabilität des Transkriptionsfaktors im Nucleus sowie zu einer verringerten transkriptionellen Aktivität von PDX1 (Meng et al., 2010; Welker et al., 2013).

Die Phosphorylierungsstellen von PDX1 sind innerhalb der Bindungsstelle des E3-Ubiquitin-Ligase-Adaptorproteins PCIF1 lokalisiert. Die Auswirkungen der CK2-Phosphorylierung auf die Bindungsaffinität von PDX1 zu PCIF1 sind umstritten. Klein et al. berichten, dass die Phosphorylierung von PDX1 durch CK2 das Verhältnis von PCIF1, das an PDX1 gebunden ist, erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten Ostertag et al., dass die CK2-abhängige Phosphorylierung von PDX1 die Bindungsaffinität zu PCIF1

verringert (Claiborn et al., 2010; Klein et al., 2017; Liu et al., 2006; Ostertag et al., 2019).

Interessanterweise wird die Biosynthese von PDX1 auch durch upstream stimulatory factors (USF) reguliert, welches ebenfalls ein Substrat der CK2 darstellt. USF1 und USF2 gehören zur Familie der basic helix-loop-helix (bHLH) leucine zipper Proteine und können das Heterodimer USF1/USF2 bilden. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass PDX1 und USF1 am PDX1-Promotor interagieren. In dieser Wechselwirkung wirkt USF1 als Transkriptionsrepressor und beeinflusst somit die Expression von PDX1. Diese Interaktionen verdeutlichen das komplexe regulatorische Netzwerk, das die Biosynthese von PDX1 steuert (Fernández-Pérez & Vallejo, 2014; Lupp et al., 2014; Spohrer et al., 2017).

Ein weiterer indirekter Einfluss der CK2 auf PDX1 erfolgt über die Phosphorylierung von MST1. Diese pro-apoptotische Kinase reagiert auf zellulären Stress, wie beispielsweise in einem diabetischen Milieu. MST1 phosphoryliert wiederum PDX1 an Threonin11 und verringert dadurch dessen Stabilität (Servas et al., 2017).

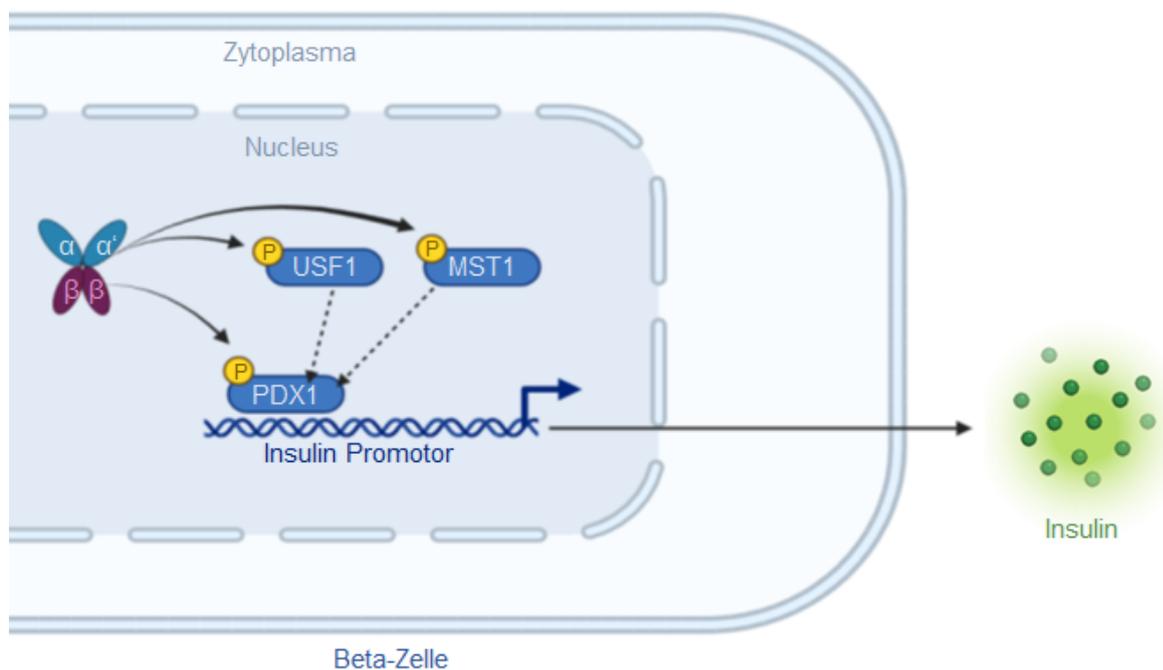


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Einflusses der CK2 auf die Insulin-Expression. Die CK2, bestehend aus zwei katalytischen α/α'-Untereinheiten (hellblau) und zwei regulatorischen β-Untereinheiten (violett), phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie USF1, MST1 und PDX1 (blau). Diese Phosphorylierung hemmt deren Aktivität, was wiederum die Insulin-Expression und daraufhin dessen Sekretion (grün) beeinflusst. (Quelle: Erstellt mit BioRender.)

4. Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten wurde der Einfluss der CK2 auf die Glukosehomöostase umfassend untersucht. Der Fokus lag dabei überwiegend auf den Auswirkungen auf die Insulin-Expression und die Funktion der pankreatischen Beta-Zellen. Allerdings ist die Rolle der CK2 bei der Regulation der GCG-Expression, die als Gegenspieler des Insulins agiert, noch weitgehend unerforscht und von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Glukosehomöostase.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, herauszufinden, ob die CK2 die GCG-Expression als Antagonist des Insulins gegensätzlich beeinflusst. Dazu wird die Spezifität der beiden CK2-Inhibitoren, SGC-CK2-1 und CX-4945, verglichen, und deren Auswirkungen auf die GCG-Expression und -Sekretion in Alpha-Zellen sowie in speziell generierten CK2-Knockout-Zellen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen behandelt werden:

- Welche Auswirkungen hat der CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 auf die zelluläre Viabilität, Proliferation, Insulin-Expression und -Sekretion in der pankreatischen Beta-Zelllinie MIN6, und inwieweit stimmen diese Effekte mit den etablierten Ergebnissen aus früheren Studien überein?
- Beeinflusst die CK2 Inhibition mittels der Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 oder der Knockout der Alpha-Untereinheiten die zelluläre Viabilität und Proliferation in α TC1-Zellen?
- Führt die Inhibition und der Knockout der CK2 zu einer verminderten GCG-Expression, und lässt sich dieser Effekt als Teil einer physiologischen Regulation interpretieren, die den Antagonisten des Insulins gegensätzlich reguliert? Sind Veränderungen im Promotorbereich oder die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren PDX1, PAX6 und MafB für diese Regulierung verantwortlich?
- Sind diese Effekte auf die GCG-Expression und -Sekretion in Pseudoinseln, isolierten murinen und humanen Inseln reproduzierbar?
- Wirken sich Knockouts von CK2 α oder CK2 α' unterschiedlich auf die GCG-Expression aus?

5. Material

5.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A/A-Mut.	Alanin/Alanin-Mutante
A. dest	Aqua destillata
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether) -N, N, N', N'-tetraessigsäure
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde

Material

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
Lin	Linsitinib
M	Mol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min	Minute
mRNA	messenger RNA
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription

Material

	Polymerase Chain Reaction
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Sodium-dodecylsulfat
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt
WT	Wildtyp
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

5.2 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Eigenschaft/ Ursprung	Nummer
α TC1 clone 6	Adhärente Zellen, Alpha-Zellen des Pankreas, (Maus-Adenom)	ATCC® CRL-2934™
α TC1 clone 6 Δ CK2 α	Adhärente Zellen, Alpha-Zellen des Pankreas, (Maus-Adenom), CRISPR/Cas9-Methode	ATCC® CRL-2934™ (+ Transfektion)
α TC1 clone 6 Δ CK2 α'	Adhärente Zellen, Alpha-Zellen des Pankreas, (Maus-Adenom), CRISPR/Cas9-Methode	ATCC® CRL-2934™ (+ Transfektion)
MIN6	Adhärente Zellen, Beta-Zellen des Pankreas, (Maus-Insulinom)	Cellosaurus (CVCL_0431)

5.3 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Plasmide und Referenz.

Plasmid	Referenz
pD1431-Apuro:441627 (α TC1 CK2 α KO)	ATUMBio, Kalifornien, USA
pD1431-Apuro:511938 (α TC1 CK2 α' KO)	ATUMBio, Kalifornien, USA
P3XFLAG-CMV-PDX1-WT P3XFLAG-CMV-PDX1-T231A/S232A	Klein et al., 2016; PMID: 28036027
pGL4-GCG	Ampofo et al., 2024; PMID: 38503901

5.4 Antikörper

5.4.1 Primär-Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper und Hersteller.

Primär-Antikörper	Hersteller
Anti- α -Tubulin (Verd. 1:1000), HRP	Proteintech (HRP-66031); Maus
Anti-GAPDH (Verd. 1:1000), HRP	Proteintech (HRP-60004); Maus
Anti-PDX1 (Verd. 1:100)	Santa Cruz (sc-25403); Kaninchen
Anti-Nucleolin (1:1000)	Abcam (ab70493); Kaninchen
Anti-Akt1 (phospho S129), (1:100)	Abcam (ab133458); Kaninchen
Anti-CK2 α , α' (1:000)	Dr. W. Nastainczyk; Kaninchen
Anti-CK2 β (1:100)	Santa Cruz (sc-12739); Maus
Anti-Insulin (1:1000)	Abcam (ab108326); Kaninchen
Anti-Pro-GCG (1:100)	Abcam (ab92517); Kaninchen
Anti PAX6 (1:100)	Abcam (ab109233); Kaninchen
Anti MafB (1:100)	Bethyl Laboratories (A700-046); Kaninchen

5.4.2 Sekundär-Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Sekundär-Antikörper und Hersteller.

Sekundär-Antikörper	Hersteller
Mouse IgG HRP (1:1000)	R&D Systems (HAF007)
Rabbit IgG HRP (1:1000)	R&D Systems (HAF008)

5.4.3 Primer /Primersequenzen

Tabelle 5: Name der Primer und Sequenzen.

Name	Sequenz (5' nach 3')
GCG-fw	TGGA CT CCCCGCCGTGCTCAAG
GCG-rv	CCTTTGCTGCCTGGCCCTCC
INS1-fw	GGGGAGCGTGGCTTCTTCTA
INS1-rv	GGGGACAGAATTCAGTGGCA
B-Akt fw	CCTAGGCACCAGGGTGTGA T
B-Akt rv	TCTCCATGTCGTCCCAGTTG

5.5 Chemikalien und Enzyme

5.5.1 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien und Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
CX-4945	Selleckchem, Houston
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Pharmacia Biotech, Schweden
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
FCS	Biochrom GmbH, Berlin

Kollagenase	Nordmark Pharma GmbH, Uetersen
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton® X-100	Merck, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

5.5.2 Geräte

Tabelle 7: Gerät und Hersteller.

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav ® 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
BioRep-Perifusionssystem	BioRep, USA
Brutschrank Heraeus 6000 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Inc., Hanau
charge-couple device (CCD) Kamera	TILL Photonics, Kaufbeuren
ChemoCam Imager	tas GmbH, Deutschland
CO ₂ Inkubator	Binder GmbH, Deutschland
DeNovix DS-11 Spektrophotometer	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Digitalkamera Olympus DP73	Olympus GmbH, Deutschland
ECL Chemocam Imager	Intas GmbH, Deutschland
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Infinite M200 Pro TECAN Reader	Sigma-Aldrich, München
LUNA Automated Cell Counter	Bio-Cat GmbH, Deutschland

Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco21	Thermo Fisher, Deutschland
Molecular Imager® Gel Doc™ XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Photometer	GeneQuant pro, Deutschland
pH-Meter 211	HANNA Instruments GmbH & Co. KG
Plattenlesegeräts PHOmo	nthos, Deutschland
Sterilbank (Mars safety Class 2)	SCANLAF, Deutschland
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Ultraschallbad Transonic 460	Elma Schmidbauer GmbH, Singen
Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen

5.6 Kulturmedien und Zusätze

5.6.1 Medien

Tabelle 8: Medien und Hersteller.

Medium	Hersteller
DMEM (4,5 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
DMEM (1 g/l Glukose)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
FCS Superior	Biochrom GmbH, Deutschland
Pen/Strep	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Trypsin 0,5%/EDTA 0,002%-Lösung	PAN-Biotech GmbH, Deutschland

5.6.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Name der Lösungen und verwendete Reagenzen.

APS	1 g APS in 10 ml H ₂ O
Blocklösung (5% BSA)	5 g BSA in 100 ml TBS-T Puffer
PMSF	174 mg PMSF in 10 ml Isopropanol
Protein Lyse Puffer	100 µl TRIS (1 M, pH 7,5) 20 µl NaCl (5 M) 4 µl EDTA 500 µl Triton-x-100 50 µl NaN ₃ In 10 ml H ₂ O
Zugabe vor Herstellung von Proteinlysaten:	1:500 PMSF 1:100 Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1:100 Protease-Inhibitor Cocktail
Transferpuffer	1,453 g TRIS 7,206 g Glycin 10% Methanol In 1000 ml H ₂ O
TRIS (1 M, pH 8,8)	181,65 g TRIS In 800 ml H ₂ O pH (8,8) mit HCl (99%) einstellen
TRIS (1 M, pH 6,8)	181,65 g TRIS

Material

	In 800 ml H ₂ O pH (6,8) mit HCl (99%) einstellen
5 x Laufpuffer	15,1 g TRIS Base 72 g Glycin 5 g SDS In 1000 ml H ₂ O
10% SDS	19 g SDS in 1000 ml H ₂ O
10 x TBS Puffer	100 ml TRIS (1 M, pH 7,5) 10 g NaCl In 1000 ml H ₂ O
1 x TBS-T Puffer	900 ml H ₂ O 100 ml 10 x TBS Puffer 1 ml Tween 20

5.6.3 Material

Tabelle 10: Material und Hersteller.

Material	Hersteller
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare GmbH, Solingen
Amersham TM Hybond TM PVDF-Membran	GE Healthcare GmbH, Solingen
Blutglukosemesssystem	GL50; Breuer, Deutschland
Einfrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Deutschland

Material

GCG Quantikine ELISA-Kits	R&D Systems, Inc.; Kanada
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Glukose-abhängiges insulinotropes Polypeptid (GIP)	Anaspec, USA
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Handschuhe	Roth GmbH, Deutschland
HepatoQuick®	Stago, Asnières sur Seine, Frankreich
Hoechst 33342	Roche, Deutschland
Kanüle 34G	Microfil, USA
Ketamin (Urostamin)	Serumwerk Bernburg AG, Deutschland
Laemmli- Puffer	Merck KgaA, Deutschland
Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
LUNA™ Cell Counting Slides	Bio-Cat GmbH, Deutschland
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad, Deutschland
ORATM qPCR ROX L Mix Kits	HighQu GmbH, Deutschland
Pipette (2, 10, 200, 1000 µl)	Roth GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Deutschland
Phosphate buffered saline 10x	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Deutschland
qScriber™ cDNA Synthesis Kit	HighQu GmbH, Deutschland
Rat Insulin ELISA-Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Scientific GeneJet Plasmid miniprep und Midiprep Kits	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Spüllösung (H ₂ O)	Braun Melsungen AG, Deutschland
Standard-Pellet-Futter	Altromin, Lage, Deutschland
Stellux Insulin Chemiluminescence ELISA	Alpco, USA
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

U-PLEX Mouse GCG Assay	Meso Scale Diagnostics, #K1525YK, USA
Western Blot Inkubationsboxen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Xylazin (Rompun)	Bayer Vital GmbH, Deutschland
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Deutschland
2 ml/5 ml/10 ml Einmalspritze Injekt® Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
24/96-Well Platte	Greiner Bio-One, Deutschland
96-Loch Platten weiß Nunc®	Sigma-Aldrich, München
µMacSTM Streptavidin-Kit	Miltenyi Biotech, Deutschland

5.6.4 Software

Tabelle 11: Software und Hersteller

Graphpad Prism 8	GraphPad Software, Boston
Fiji ImageJ	Open Source, Github
LabImage 1D-Software	Intas Science Imaging, Deutschland
Microsoft Office Excel	Systat Software GmbH, Deutschland
ChemoStar	INTas GmbH, Deutschland
Quantiy One® 1D Analysis Software 4.6.5	Bio-Rad Laboratories Software, Deutschland

5.6.5 Protein- Molekulargewichtsmarker

Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa) von Thermo Fisher wird verwendet, um die Auftrennung von Proteinen während der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zu visualisieren, die Effizienz des Transfers zu überprüfen und die Proteingrößen im Western Blot abzuschätzen (Abb. 5, links). Für größere Proteine wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 bis 250 kDa) von selbiger Firma verwendet (Abb. 2, rechts).

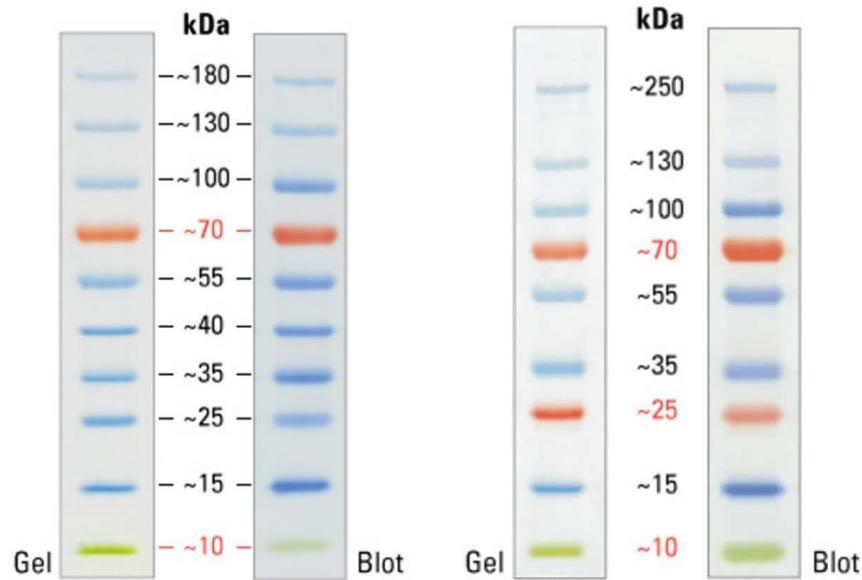


Abbildung 2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa; links) und PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 bis 250 kDa; rechts) (Quelle: ThermoFisher).

6. Methoden

6.2 Zellen

6.2.1 Kultivierung von Zellen

In dieser Arbeit wurden die etablierten Zelllinien α TC1 und MIN6 genutzt, ebenso wie spezielle α TC1-Zelllinien, bei denen mittels CRISPR/Cas9-Technologie ein Knockout von CK2 α oder CK2 α' erzielt wurde. Die Kultivierung der α TC1-Zelllinien erfolgte in DMEM Medium mit 5,5 mM Glukose (1 g/l). Die MIN6-Zelllinie wurde in DMEM-Medium mit 25 mM Glukose (4,5 g/l) kultiviert. Dem Medium wurden noch zusätzlich 10% fetales Kälberserum (FCS), sowie 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

6.2.2 Knockout-Zelllinien

Mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode wurden Knockouts der katalytischen CK2 α - bzw der CK2 α' -Untereinheit in α TC1-Zellen (α TC1 CK2 α KO-bzw. CK2 α' KO-Zellen) hergestellt. Hierfür wurden die Plasmide mit spezifischer guideRNA (gRNA) über die

Webseite <https://www.atum.bio/> bestellt. Die Transfektion wurde mit Lipofectamine 3000 durchgeführt. Nach 48 h wurden die Zellen mit Puromycin (2 µg/ml) behandelt, welches alle drei Tage erneuert wurde, um das Wachstum von wildtypischen αTC1-Zellen zu verhindern. Für die Verifizierung der αTC1 CK2α KO bzw. CK2α' KO-Zellen wurden Western Blots und qRT-PCRs durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Protein-Expression der CK2α- bzw. CK2α'-Untereinheit einer KO-Zelllinie entspricht. Um ein homogenes Wachstum der αTC1 KO-Zelllinien zu gewährleisten, wurden diese dauerhaft in Puromycin-haltigem Medium (2 µg/ml) kultiviert. Das Antibiotikum wurde alle drei Tage erneuert, wobei 24 h vor Beginn eines Versuchs die Verabreichung von Puromycin eingestellt und das Medium ausgetauscht wurde.

6.2.3 Auftauen von Zellen

Die langfristige Kultivierung von Zellen kann verschiedene negative Auswirkungen auf deren Morphologie, Viabilität und genetische Stabilität haben. Aus diesem Grund wurden nur die Zellen in Kultur gehalten, die aktiv in den Experimenten verwendet wurden. Hierfür wurden Kryoröhrchen mit den entsprechenden Zellen in einem Wasserbad aufgewärmt und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt, das bereits 5 ml 1x PBS (mit 10% FCS) enthielt. Das Reaktionsgefäß wurde für 5 min bei 600 xg (RT) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit dem Zellmedium resuspendiert, bevor es in Zellkulturschalen überführt wurde.

6.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen wurde zunächst das Zellmedium entfernt, gefolgt von einem Waschschrift mit 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5-minütige Inkubation bei 37°C mit einer (10x) Trypsin-0,5%/EDTA-0,002%-Lösung abgelöst. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde anschließend das dreifache Volumen PBS/10% FCS hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei 600 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 1,8 ml Kryolösung, bestehend aus Zellmedium mit 20% DMSO und FCS im Verhältnis 1:1, resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Zum Schutz der Zellen wurden diese

zunächst in einem Einfrierbehälter auf -80°C gekühlt und am darauffolgenden Tag in einem Stickstoffbehälter gelagert.

6.2.5 Splitten von Zellen

Bevor die Zellen die maximale Dichte erreichten, wurde das vorhandene Medium abgenommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von (10x) Trypsin 0,5%/EDTA 0,002%-Lösung und einer Inkubation der Zellen für 5 min bei 37°C wurden die abgelösten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 600 xg zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und anschließend auf geeignete Zellkulturgefäße ausplattiert.

6.2.6 CK2 Inhibitoren: CX-4945 und SGC-CK2-1

In der vorliegenden Arbeit wurden die Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 zur Inhibition der CK2 in αTC1 -Zellen verwendet. Bei beiden Inhibitoren handelt es sich um ATP-kompetitive Inhibitoren der Proteinkinase CK2, welche die Nukleotid-Bindestelle der CK2 inhibieren und somit die ATP-Bindung signifikant reduzieren. Für die Verwendung der Inhibitoren wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO hergestellt. Die Lagerung der Stocklösungen erfolgte bei -20°C . Zur Behandlung der Zellen wurde zunächst das vorhandene Medium entfernt und durch Medium ersetzt, das entweder CX-4945 oder SGC-CK2-1 enthielt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen ausschließlich einmalig mit einer Dosis von 10 μM der Inhibitoren behandelt. Eine erneute Zugabe der Inhibitoren erfolgte nicht.

6.2.7 Bestimmung der Zellzahl

Nach Ablösen der Zellen, wurde das Zellpellet in 5 ml Medium gelöst. In ein Reaktionsgefäß wurden 10 μl Trypanblau, sowie 80 μl 1x PBS vorgelegt. Von der gelösten Zellsuspension wurden 10 μl zu dem Trypanblau/1x PBS-Gemisch gegeben und nach mehrmaligen resuspendieren wurden 10 μl in eine Neubauer Zählkammer überführt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die vier Großquadrate der Zählkammer

ausgezählt und gemittelt. Mithilfe der folgenden Formel wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt:

$$\text{Mittelwert} \times 10^4 \times 10 \times 5 = \text{Zellzahl}$$

6.2.8 Water soluble Tetrazolinium (WST) - Assay

In eine 96-Well-Platte wurden in jede Vertiefung jeweils 100 μl Medium mit $7,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die αTC1 -Zellen mit CX-4945 (10 μM) und SGC-CK2-1 (10 μM) behandelt. Als Kontrolle dienten gleiche Volumina des Lösungsmittels (DMSO). Bei den αTC1 CK2 α bzw. CK2 α' KO-Zelllinien fand lediglich ein Medienwechsel statt. Nach 24 h wurde das WST-Assay zur Untersuchung der mitochondrialen Aktivität verwendet. Hierfür wurden 10 μl des WST-Reagenz in jede Vertiefung der 96-Well-Platte pipettiert und diese für 30 min bei 37°C inkubiert. Hierbei kommt es zur Umwandlung des Farbstoffs, welcher in Abhängigkeit von mitochondrialen Dehydrogenasen in Formazan umgewandelt wird. Danach wurde die 96-Well-Platte für 1 min auf einen Schüttler gestellt. Mithilfe eines Photometers wurde die Umwandlung des Farbstoffs in Formazan bei einer Wellenlänge von 450 nm und bei einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm gemessen.

6.2.9 Lactat-Dehydrogenase (LDH) - Assay

Analog zum WST-Assay wurden die Zellen ebenfalls in eine 96-Well Platte ausgesät und mit den CK2 Inhibitoren behandelt oder bei den αTC1 KO-Zelllinien das Medium gewechselt. Nach 24 h wurden zunächst 5 Vertiefungen der 96-Well Platte mit je 5 μl Lysis-Solution versetzt, die vollständig lysierten Zellen dienten hierbei als Positivkontrolle. Nachdem die Inkubationszeit von 15 min abgelaufen war, wurden 100 μl einer Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Diese Lösung bestand aus 2,5 μl Katalysator-Lösung und 97,5 μl Färbelösung. Anschließend wurde die 96-Well-Platte für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 50 μl der Stop-Lösung zugegeben. Die Messung wurde mit dem Photometer durchgeführt, wobei eine Referenz von 492 nm und eine Referenzwellenlänge von 620 nm verwendet wurden.

6.2.10 Wachstumskurve

Die α TC1-Zelllinien wurden abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation der Zellsuspension bei 600 xg für 5 min verworfen, und das Zellpellet wurde in 4 ml DMEM (mit 5 mM Glukose) resuspendiert. Daraufhin wurde ein weiteres Reaktionsgefäß mit 12,5 ml des gleichen Mediums vorbereitet. Zur Herstellung einer Verdünnung, wurde 1 ml der Zellsuspension in das zweite Reaktionsgefäß (mit 12,5 ml Medium) überführt. Anschließend wurden in jede Vertiefung einer 24-Well-Platte 500 μ l der Verdünnungskultur übertragen. Nach 24 h wurden die Zellen mit den CK2 Inhibitoren behandelt, als Kontrolle diente DMSO in dem gleichen Volumen. Bei den α TC1 CK2 α bzw. CK2 α' KO-Zelllinien fand lediglich ein Mediumwechsel statt. Nach 24 h, 48 h sowie 72 h der Behandlung wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin abgelöst und anschließend für 5 min bei 600 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellpellets wurden in 30 μ l PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellviabilität und Zellzahl wurden zunächst 10 μ l Trypanblau in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 10 μ l der Zellsuspension zu dem Trypanblau gegeben. Jeweils 10 μ l des Trypanblau/Zell-Gemischs wurden dann in spezielle LUNA™ Cell Counting Slides pipettiert. Mit Hilfe des LUNA™ Automated Cell Counters wurde die Viabilität sowie die Gesamt- und Lebendzellzahl bestimmt.

6.2.11 Transiente Transfektion von Zellen

Es wurden vier verschiedene Vektoren transient in α TC1-Zellen eingeführt. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz. Dieses Reagenz verwendet ein Lipid-Nanopartikel-Verfahren und zeigt eine hohe Transfektionseffizienz. Es bietet verbesserte Zellviabilität und eignet sich für eine Vielzahl von Zelllinien, einschließlich solcher, die schwer zu transfizieren sind. Hierfür wurden in eine 24-Well-Platte α TC1-Zellen ausgesät, die am folgenden Tag eine Konfluenz von 60-80% aufwiesen. Der Transfektionsansatz in einer Vertiefung setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 12: Zusammensetzung des Transfektionssansatzes.

Reaktionsgefäß 1	Reaktionsgefäß 2
25 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium	25 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium
1,5 µl Lipofectamin 3000	500 ng P3000/ µl
250 ng Plasmid/ Well	

Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden zusammengeführt und durch kurzes Schnippen leicht vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Transfektionsansatz aus Lipofectamin und Plasmid tropfenweise zu den α TC1-Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet.

6.2.12 Luciferase-Reporter-Assay

Mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Assays können spezifische Regionen wie Enhancer und Promotoren auf ihre Aktivität untersucht werden. Durch Zugabe des Firefly-Luciferase-Reagenzes kommt es zur Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin in Gegenwart von Sauerstoff, ATP und Magnesium-Ionen. Diese Reaktion ermöglicht eine direkte Messung der Aktivität des jeweiligen Promotors, der die Expression der Luciferase steuerte. Zu Beginn wurden α TC1-Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät, die am nächsten Tag eine Konfluenz von 60-80% erreicht hatten. Anschließend wurden mittels Transfektion sowohl der pFlag-PDX1 WT, pFlag-PDX1 AA, pGL4-GCG, oder der pGL4-Leervektor als Kontrolle, in die α TC1-Zelllinien transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion durch Zugabe von 50 µl Lysepuffer geerntet, die Zellen wurden dabei für 20 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 14000 xg (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, während die Pellets verworfen wurden. Die Proben wurden entweder dauerhaft bei -20°C aufbewahrt oder kurzzeitig auf Eis gehalten, wenn die Messung direkt anschließend durchgeführt wurde. Dazu wurden 10 µl der Proben in je eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert, wobei Duplikate für jede Probe angefertigt wurden. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Luminometer Infinite

M200 Pro. Das Gerät fügte jedem Well nacheinander 50 µl Luciferase-Reagenz hinzu und maß die Luciferase-Aktivität für 10 s.

6.2.13 Proteinextraktion

Zur Isolation der Proteine, wurden die Zellen mit einem Plastischaber im Medium gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde für 5 min bei 600 xg zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt, und das Zellpellet in 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine erneute Zentrifugation unter denselben Bedingungen durchgeführt, wobei der Überstand erneut verworfen wurde. Der Lysepuffer wurde entsprechend der Größe des Pellets zugegeben und mit dem Zellpellet in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Extrakt für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 30 min bei 14000 xg und 4°C. Der Überstand wurde aufbewahrt. Die Proteinextrakte konnten entweder direkt zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet oder bei -20°C eingefroren werden.

6.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Bradford-Methode verwendet. Das Prinzip basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 450 nm auf 595 nm verschiebt. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums ist proportional zur Proteinmenge und wurde daher zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Das Bradford-Reagenz wurde zunächst mit H₂O angesetzt. Dazu wurden 800 µl H₂O mit 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate versetzt. Die Proteinextrakte wurden durch vorsichtiges Schnippen gemischt, und 1 µl der Extrakte wurde pro Küvette hinzupipettiert. Anschließend wurden die Küvetten mittels eines Vortexers gemischt, und nach einer 10-minütigen Inkubation wurde die Proteinkonzentration bei einer Absorption von 595 nm gemessen. Eine Leerwert-Küvette mit Bradford-Reagenz ohne Probe diente als Kontrolle. Eine Eichkurve, die mit BSA erstellt wurde, ermöglichte die direkte Berechnung der Proteinkonzentration der Probe. Die Proben wurden zur Vorbereitung auf die SDS-Gelelektrophorese zunächst mit 2x Laemmli-Puffer gemischt

und anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt. Durch diesen Schritt wurden die Proteine denaturiert, wodurch die Disulfidbrücken und somit die Proteinstruktur aufgelöst wurden. Dadurch waren die Proteine einheitlich mit einer negativen Ladung versehen.

6.2.15 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen basierend auf ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Die Herstellung der SDS-Gele wurde gemäß den Vorgaben in Tabelle 13 und 14 durchgeführt. Zunächst wurden die Bestandteile des Trenngels pipettiert und zwischen zwei Glasplatten gegossen, um den unteren Teil des Gels zu formen. Zur Gewährleistung eines homogenen Übergangs zum nachfolgenden Sammelgel wurde das Trenngel mit Isopropanol überdeckt. Nach dem Entfernen des Isopropanol wurde gemäß der Tabelle 14 das Sammelgel hergestellt und auf das Trenngel pipettiert. Kämme mit Fassungsvermögen von entweder 15 µl oder 25 µl wurden in das Trenngel platziert. Nach der Polymerisation des Trenngels wurden die Kämme entfernt, und die vorbereiteten Gele in die Mini-Protean Tetra Cell eingesetzt. Die Kammer wurde vollständig mit Laufpuffer gefüllt, und die Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht für 1 bis 1,5 h bei 100 V aufgetrennt. Für die Zytoplasma-Kernfraktionierung wurden 10%ige Gele verwendet, für die restlichen Western Blots wurden ausschließlich 12%ige SDS-Gele genutzt. Die Beladungsmenge für alle 12%igen Gele betrug 15 µg Protein oder 10 µl der Extrakte, welche im Pull-Down-Assay hergestellt wurden, während für die Zytoplasma-Kernfraktionierung 60 µg benötigt wurden. Als Referenz dienten 5 µl der Marker aus Abschnitt 5.6.6.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Trenngele (10% und 12%).

Trenngel	10%	12%
H ₂ O	4,0 ml	3,3 ml
Acrylamid	3,3 ml	4 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels (5%).

Sammelgel	5%
H ₂ O	2,7 ml
Acrylamid	670 µl
1,0 M TRIS pH 6,8	500 µl
10% SDS	40 µl
10% APS	40 µl
TEMED	5 µl

6.2.16 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht wurde der Transfer auf eine PVDF-Membran durchgeführt. Dazu wurden 5 Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei in die untere Kammer einer Semi-Dry-Transferapparatur gelegt. Die zuvor für 20 s in Methanol aktivierte PVDF-Membran, die daraufhin im Transferpuffer aufbewahrt wurde, wurde auf diese Filterpapiere platziert. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel aus der Gelkammer vorsichtig mit einem Plastikspatel gelöst und in Transferpuffer überführt. Das Polyacrylamidgel wurde ebenfalls luftblasenfrei auf die PVDF-Membran übertragen und anschließend mit 5 Whatman-Filterpapieren bedeckt, die zuvor ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden. Nachdem die Apparatur zusammengebaut war, erfolgte der Transfer bei 25 V für 7 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die PVDF-Membran anschließend für 1 h in einer 5%igen BSA-Lösung auf einem Schüttler bei RT geblockt.

6.2.17 Antikörper

Die geblockte PVDF-Membran wurde zunächst mit 1x TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Primär-Antikörper in einem Verhältnis von 1:100 in 1% BSA verdünnt und auf die Membran pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Antikörper entfernt und die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min auf einem

Schüttler in 1x TBS-T gründlich gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der Sekundär-Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in 1% BSA vorbereitet. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte über einen Zeitraum von 1 h bei RT auf einem Schüttler, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Nach zweimaligem Waschen mit 1x TBS-T wurde die Membran mit dem Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent behandelt, um die Zielproteine zu detektieren. Die Entwicklung erfolgte anschließend im ChemoCam Imager gemäß den Herstelleranweisungen.

6.2.18 Auswertung Western Blot

Die aufgenommenen .tiff Bilder des ChemoCam Imagers wurden für die weitere Analyse als .jpg-Dateien exportiert. Mithilfe der LabImage 1D-Software wurden die Proteinbanden quantifiziert. Dabei wurden die Intensitäten der abgebildeten Banden berechnet. Anschließend wurden diese Intensitäten mit Hilfe des Microsoft Excel Programms normiert.

6.2.19 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden α TC1-Zellen mit CX-4945 (10 μ M) oder SGC-CK2-1 (10 μ M) behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO im gleichen Volumen. Die α TC1 CK2 α bzw. CK2 α ' KO-Zelllinien wurden unbehandelt verwendet. Es wurde ebenfalls die RNA von pankreatischen Langerhans-Inseln aus C57BL/6J Mäusen, sowie mit generierten Pseudoislets (PI), isoliert. Die Zellen einer geernteten 10 cm Schale wurden in 800 μ l Trizol aufgenommen, während 400 μ l für die pankreatischen Inseln und die PI ausreichte. Die Proben wurden entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert. Wenn die Zellen oder Inseln vor der Isolation eingefroren wurden, erfolgte ihr Auftauen zunächst für 10 min auf Eis. Anschließend wurden sie resuspendiert und für 5 min bei 30°C auf dem Heizblock inkubiert.

Nach der Zugabe von 200 μ l Chloroform kam es zur Bildung von drei Phasen. Die RNA befand sich nun separat von Proteinen und DNA in der oberen wässrigen Phase, die nach der Zentrifugation (9500 xg für 20 min) gebildet wurde. Dies ermöglichte eine gezielte Isolierung der RNA in einem neuen Reaktionsgefäß. Die Fällung der RNA

wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol durchgeführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann dreimal invertiert, um die Ausfällung der RNA zu unterstützen. Für eine effiziente Ausbeute wurde das Reaktionsgefäß über Nacht bei -20°C gelagert, wodurch die RNA präzipitiert werden konnte. Nach 24 h wurde die Probe für 10 min bei $12000 \times g$ (4°C) zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dem Pellet wurden $500 \mu\text{l}$ 75%iges Ethanol (-20°C) zugegeben, und das Reaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert. Die letzte Zentrifugation erfolgte für 5 min bei $7500 \times g$ (4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde an der Luft getrocknet, bis es farblos wurde.

Die RNA wurde in $10 \mu\text{l}$ RNase-freiem H_2O aufgenommen, und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde die RNA-Konzentration am DeNovix DS-11 Spektrophotometer gemessen. Als Referenz diente RNase-freies H_2O . Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurden der Quotient 260/280, der die Proteinverunreinigung widerspiegelt, und der Quotient 260/230, der eventuelle Salzverunreinigungen aufzeigt, berechnet. Die Werte dieser Quotienten sollten zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Von der isolierten RNA wurde eine $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Stocklösung hergestellt, um eine standardisierte Konzentration für die reverse Transkription zu erreichen. Dazu wurde die RNA entsprechend mit H_2O verdünnt, so dass für jeden Ansatz ein festgelegtes Volumen von $5 \mu\text{l}$ verwendet werden konnte, um eine Gesamt-RNA-Konzentration von 1000 ng pro Ansatz zu erreichen. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt, da RNA bei RT schnell instabil und abgebaut wird. Diese Lagerbedingungen wurden gewählt, um die Integrität der RNA zu erhalten und eine optimale Langzeitstabilität zu gewährleisten.

6.2.20 Reverse Transkription

Für die Umwandlung der isolierten RNA in cDNA wurde die reverse Transkription angewendet. Dabei erfolgte die Synthese der einzelsträngigen RNA zur doppelsträngigen cDNA mithilfe der reversen Transkriptase. Das qScriber™ cDNA Synthesis Kit enthielt den qScriber™ Reaction Mix, der dNTPs, MgCl_2 und verankerte Oligos(dT) enthielt, sowie den 5x qScriber™ Enzyme Blend, 20x. Die Durchführung erfolgte gemäß dem beigefügten Herstellerprotokoll, wobei zunächst ein Mastermix mit den Bestandteilen aus Tabelle 15 hergestellt wurde. Nach vorsichtigem Schnippen der

Probe wurde diese für 30 min bei 42-50°C inkubiert, um die cDNA zu synthetisieren. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 10 min bei 85°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt für die qRT-PCR verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription.

Zusammensetzung	Ansatz (20 µl)
5X qScriber™ Enzyme Blend, 20X	4 µl
qScriber™ Reaction Mix	1 µl
RNA (1000 ng)	5 µl
PCR Wasser	10 µl

6.2.21 quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Die während der reversen Transkription synthetisierte cDNA wurde für die qRT-PCR verwendet. Dabei wurde der Farbstoff SYBR Green eingesetzt, der hochspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Dies ermöglichte es, die Amplifikation der DNA in Echtzeit zu beobachten und zu analysieren. Die Bindung von SYBR Green an doppelsträngige DNA führte zur Emission von grünem Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Nach jedem abgeschlossenen Zyklus erfolgte die Messung. Die Intensität der emittierten Signale ermöglichte Rückschlüsse auf die Anzahl der mRNA-Moleküle. Aufgrund der geringen Spezifität dieser Methode, bei der SYBR Green an jede doppelsträngige DNA bindet, wurde zur Kontrolle eine Schmelzkurve für jede Probe erstellt. Dabei wurde die DNA durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 50°C bis 95°C aufgeschmolzen. Der genaue Zeitpunkt, zu dem die Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen erfolgte, war spezifisch für jede cDNA. Dies ermöglichte eine präzise Charakterisierung der Zielmoleküle in den Proben.

Für die qRT-PCR-Analyse wurden verschiedene Zelltypen verwendet, darunter α TC1-Zellen (WT- und CK2 α bzw. CK2 α ' KO-Zelllinien), MIN6-Zellen und PI sowie isolierte Langerhans-Inseln. Es wurde eine cDNA-Stocklösung mit einer Konzentration von 50 ng/µl hergestellt. Für jede PCR-Reaktion wurden präzise 2 µl dieser

standardisierten cDNA-Lösung verwendet. Als Kontrolle diente PCR-Wasser. Die Durchführung der qRT-PCR wurde unter Verwendung des ORATM qPCR ROX L Mix Kits durchgeführt. Dieses Kit enthielt alle erforderlichen Komponenten für die Reaktion, mit Ausnahme der verwendeten Primer. Das qRT-PCR-Programm wurde ebenfalls gemäß den Anweisungen des Herstellerprotokolls durchgeführt (Tab. 16 und 17).

Das Expressionslevel der mRNA wurde durch die Bestimmung der Zyklenzahl in Abhängigkeit von der Intensität des Fluoreszenzsignals berechnet. Der resultierende Wert, bekannt als Quantification Cycle (Cq)-Wert, dient als Maß für die Genexpression. Ein niedrigerer Cq-Wert deutet auf einen höheren Gehalt an gemessener mRNA hin. Zur Normierung aller Proben wurde das Haushaltsgen β -Aktin verwendet, das in allen Zellen vorhanden ist und nicht von den durchgeführten Behandlungen beeinflusst wird. Anschließend wurden die Werte auf die jeweilige Kontrolle normiert.

Für die Berechnung der Expressionslevel wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}} \quad \Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP Behandlung} - \Delta\text{CP Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR.

Zusammensetzung	Ansatz (18 μl)
ORA TM qPCR Mix, 2X	10 μ l
Forward Primer (100 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (100 μ M)	1 μ l
PCR-Wasser	6 μ l

Tabelle 17: Ablauf des qRT-PCR-Programms. Die Schritte der Denaturierung und des Annealing werden 39-mal wiederholt.

PCR-Programm	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	5 s (x39)
Annealing/Extension	60°C	30 s (x39)
Schmelzkurve	50°C – 95°C	5 s

6.2.22 Zytoplasma-Kernfraktionierung

Es wurden α TC1-Zellen mit CX-4945 oder SGC-CK2-1 behandelt, als Kontrolle diente dasselbe Volumen des Lösungsmittels (DMSO). Bei den α TC1 KO-Zelllinien fand lediglich ein Medienwechsel statt. Nach 24 h wurde das Medium der Zellen abgesaugt und sie wurden zweimal mit jeweils 4 ml 1x PBS bei 4°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Plastikschaaber in 500 μ l 1x PBS abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde dann für 5 min bei 12400 xg (4°C) zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 40 μ l Puffer A (Tab. 18) zur Isolation der Zytoplasmafraktion wurden die Proben für 20 min auf Eis gehalten, wobei alle 5 min die Probe auf einem Vortexer gemischt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort bei -20°C eingefroren oder für die Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis gelagert. Die Zugabe von 40 μ l Puffer C (Tab. 19) diente zur Extraktion der Kernfraktion, und das Reaktionsgefäß wurde für 20 min auf Eis inkubiert, wobei alle 5 min die Probe auf einem Vortexer gemischt wurde. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 12400 xg (4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ähnlich wie bei der Zytoplasmafraktion konnte die Kernfraktion entweder bei -20°C eingefroren oder direkt für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode verwendet werden.

Tabelle 18: Komponenten des Puffer A.

Zusammensetzung	10 ml
10 mM HEPES-KOH (pH 7,9)	23 mg
10% Glycerol	1 ml
10 mM KCl	7,4 mg
1,5 mM MgCl ₂	3 mg
1 mM EGTA	3,8 mg
1 mM DTT	15,4 mg
1% NP40	100 µl
Protease-Inhibitor	1:100

Tabelle 19: Komponenten des Puffer C.

Zusammensetzung	10 ml
10 mM HEPES-KOH (pH 7,9)	23 mg
10% Glycerol	1 ml
500 mM NaCl	290 mg
1,5 mM MgCl ₂	3 mg
0,2 mM EDTA	0,58 mg
Protease-Inhibitor	1:100

6.2.23 Streptavidin-Agarose Pull-Down-Assay

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren an den GCG-Promotor wurde das µMacTM Streptavidin-Kit sowie biotinylierte Primer zur Herstellung einer biotinylierten DNA-Sonde im Bereich von -329 bis +8 des murinen GCG-Gens verwendet. Für das Pull-Down-Assay wurden 1 mg Kernextrakte von αTC1 WT- und KO-Zelllinien verwendet. Diese Extrakte wurden mit Lachsspermien-DNA (100 µg/ml) für 20 min bei 4°C vorinkubiert. Danach wurde 1 µg der biotinylierten DNA-Sonde zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Fünfzig µl Streptavidinagarose Beads wurden zugegeben und für 12 min bei RT inkubiert. Der DNA-Proteinkomplex

wurde durch eine äquilibrierte μ MacTM-Säule geleitet, die Säule wurde mehrmals durch Zugabe von Puffer C gewaschen und die Proteine wurden mittels der Zugabe von 1x Ladepuffer (90°C) eluiert. Die Eluate wurden dann mit der Western-Blot-Methode analysiert.

Forward: 5'-Biotin-GACCCTCAAATGAGACTAGG-3'

Reverse: 5'-Biotin-GCCCTTCTGCACCAG-3'

6.2.24 Generierung von Pseudoinseln (PI)

Die PI wurden mittels der Liquid-Overlay-Technik in 96-Well-Platten erzeugt. Diese Platten waren im Vorfeld mit einer Schicht aus 1%iger Agarose versehen worden, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Hierfür wurden 3500 MIN6-Zellen und 1500 α TC1- oder α TC1 CK2 α bzw. CK2 α ' KO-Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 5 Tage inkubiert. Das Kulturmedium (DMEM mit 4,5 g Glukose pro Liter) wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die PI geerntet und entweder für immunhistochemische Analysen oder ELISA aufbewahrt.

6.2.25 Einbetten generierter Pseudoinseln (PI) in eine HepatoQuick[®]-Matrix

Für die Durchführung immunhistochemischer Färbungen der generierten PI mussten diese zunächst in eine HepatoQuick[®]-Matrix eingebettet werden. Hierfür wurden 100 μ l HepatoQuick[®], 50 μ l platelet-poor plasma (PPP; eigene Herstellung) und 10 μ l einer 10%igen CaCl₂-Lösung in den Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes pipettiert. Nach 45 min bei 37°C hatte sich das Gemisch so weit verfestigt, dass die mittlere Schicht, bestehend aus 10 PI in 10 μ l HepatoQuick[®], 5 μ l PPP und 1 μ l CaCl₂-Lösung, auf die erste Schicht aufgetragen werden konnte. Die PI wurden durch eine weitere Inkubation von 15 min bei 37°C auf der unteren Matrix fixiert. Anschließend wurde die dritte und letzte Schicht aufgetragen, die dieselbe Zusammensetzung wie die erste Schicht hatte. Nach einer weiteren Inkubation von 60 min bei 37°C wurde die Matrix mithilfe einer Kanüle aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes entfernt. Die entnommene Matrix

wurde für die nachfolgenden immunhistochemischen Analysen 24 h lang bei 4°C in 4% Paraformaldehyd fixiert.

6.2.26 Immunhistochemische Analysen

Nach der Generierung der PI mittels der zuvor beschriebenen Liquid-Overlay-Technik wurden diese für 45 min bei 37°C in 100 µl HepatoQuick®, 50 µl menschlichem Citratplasma und 10 µl 10%iger CaCl₂-Lösung inkubiert. Das Gemisch wurde außerdem 24 h lang in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Nach der Dehydrierung wurden die in Paraffin eingebetteten Proben in 3 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Antigene in den Proben wurden mit Citratpuffer demaskiert, und die unspezifischen Bindungsstellen wurden blockiert. Die Zellen wurden mit spezifischen Primär-Antikörpern (1:300) inkubiert, die mit den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörpern (1:1000) nachgewiesen wurden. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Die Schnitte wurden mit einem BX60F Fluoreszenzmikroskop (Olympus) analysiert.

6.3 Experimente im Maus-Modell

6.3.1 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und dem National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Die Pflege und Verwendung der Versuchstiere erfolgte gemäß den Richtlinien des *Institute of Laboratory Animal Resources des National Research Council* (Washington DC, USA). Die Experimente wurden von der örtlichen Tierschutzkommission sowie dem Landesamt für Verbraucherschutz (Abt. C „Veterinärwesen, Tierschutz“; Saarbrücken, Deutschland) genehmigt (18/2017 und 46/2018). Die Versuchstiere dieser Studie wurden unter einem 12 h/12 h Licht-Dunkel-Zyklus bei Raumtemperaturen von 20°C bis 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10% in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten. Außerhalb der Versuche hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu Standard-Pellet-Futter und Wasser. Neben der

regelmäßigen Kontrolle des Allgemeinzustands der Versuchstiere wurden auch ihr Verhalten und ihr Körpergewicht sorgfältig überwacht. C57BL/6J-Mäuse im Alter von 3-12 Monaten wurden als Spender für die Inselisolierung, als Empfänger für die Transplantation und für die Behandlung mit dem CK2 Inhibitor CX-4945 verwendet.

6.3.2 Entnahme des Pankreas aus Mäusen und Isolation von pankreatischen Inseln

Die folgenden Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Selina Wrublewsky durchgeführt, die für die Operationen verantwortlich war.

Um Langerhans-Inseln für das qRT-PCR-Verfahren zu erhalten, wurde zunächst das Pankreas einer C57BL/6J-Maus entnommen, um anschließend die Inseln daraus zu isolieren. Als Spendertiere für die Isolation von Langerhans-Inseln wurden C57BL/6J-Mäuse mit einem Gewicht von 22 bis 26 g verwendet (Tab. 20). Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte nach der Methode von Gotoh et al. (Gotoh et al., 1987). Für die Narkose des Versuchstiers wurde eine intraperitoneale Injektion (i.p.) von Ketamin und Xylazin in den Dosierungen von 85 mg/kg Körpergewicht bzw. 60 mg/kg Körpergewicht verwendet. Das Töten der Maus erfolgte durch zervikale Dislokation, in Übereinstimmung mit den geltenden ethischen Richtlinien und Vorschriften. Dies schloss insbesondere die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG), der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie die Leitlinien des zuständigen Ethikkomitees und die spezifischen Vorschriften der Versuchstierkunde ein. Die Maus wurde in Rückenlage fixiert und das Abdomen wurde mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Anschließend erfolgte eine mediane Laparotomie, um den Bauchraum zu öffnen, wobei der Gastrointestinaltrakt zur rechten Seite ausgelagert wurde. Um sicherzustellen, dass die Kollagenase nicht aus dem Pankreas floss, wurde der Ductus choledochus mit einem Faden ligiert, sodass das Enzym das Gewebe vollständig durchdringen konnte. Eine kleine Öffnung wurde vor der Papilla Vateri inzidiert, und eine flexible 34 G Kanüle wurde in den Ductus pancreaticus eingeführt. Nachdem die Kanüle mit einem zusätzlichen Faden fixiert worden war, wurde 1 ml der Kollagenase-Lösung (bei 4°C; bestehend aus 5 mg Kollagenasepulver, 5 ml HBSS und 250 µl Neutralrot) in das Pankreas injiziert. Nach erfolgreicher Injektion wurde das Pankreas aus dem Abdomen entnommen und in ein

15 ml Reaktionsgefäß überführt, das mit weiterer Kollagenase-Lösung versehen war. Das Reaktionsgefäß wurde bis zum Erreichen des Wasserbads auf Eis gehalten. Dort wurde es für eine Dauer von 15 min bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Diese Phase war entscheidend für die Aktivierung der Kollagenase, die darauf abzielte, das umliegende exokrine Gewebe um die Langerhans-Inseln zu verdauen. Eine unzureichend kurze Inkubation hätte zur Folge gehabt, dass nicht genügend exokrines Gewebe verdaut worden wäre, während eine zu lange Inkubation die Langerhans-Inseln beschädigen könnte. Daher wurde der Verdau nach 15 min gestoppt, indem 7 ml 1x PBS (mit 10% FCS) hinzugefügt wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Reaktionsgefäßes für 3 min bei 300 xg (RT). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Gewebe dreimal mit 10 ml 1x PBS (10% FCS) gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte die Zentrifugation des Reaktionsgefäßes unter denselben Einstellungen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml 1x PBS (10% FCS) aufgenommen. In diesem Pellet befanden sich die Langerhans-Inseln zusammen mit noch verbliebenem exokrinem Gewebe, das manuell entfernt werden musste. Dazu wurde das resuspendierte Pellet in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Die Langerhans-Inseln wurden mit einer 200 µl Pipette in eine neue Zellkulturschale mit 1x PBS (10% FCS) überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis kein exokrines Gewebe mehr in den Schalen verblieb. Schließlich wurden die isolierten Inseln in einer 10 cm Zellkulturschale aufbewahrt, die mit 10 ml DMEM (10% FCS, 1% Pen/Strep und 5,5 mM Glukose) gefüllt war. Die Behandlung der Inseln erfolgte 24 h nach ihrer Isolierung.

Tabelle 20: Einzelheiten zu den verwendeten C57BL/6J-Mäusen.

Experiment	Anzahl	Geschlecht	Alter (Wochen)	Körpergewicht (g)
Spender: qRT-PCR	1	Weiblich	42	27
	1	Weiblich	48	29
	1	Männlich	40	31
	1	Männlich	37	31
Spender: Sekretion	2	Weiblich	44	25-29
	1	Weiblich	20	20
	1	Weiblich	29	24
	1	Männlich	40	33
	1	Männlich	13	21
	1	Männlich	28	29
Empfänger: αTC1 WT	3	Weiblich	24	20-23
	3	Männlich	17	22-26
Empfänger: αTC1 CK2α KO	3	Weiblich	24	21-23
	3	Männlich	19	23-25
Empfänger: sham	3	Weiblich	24	20-24
	2	Männlich	20	22-26

6.3.3 Murines Nierenkapsel-Modell

Shamtransplantierte Mäuse, die zwar operiert wurden, aber keine Transplantate erhielten, dienten als Kontrolle. Normoglykämische C57BL/6J-Mäuse wurden betäubt und 5×10^6 αTC1- oder αTC1 CK2α KO-Zellen wurden unter die linke Nierenkapsel

injiziert. Körpergewichte und Nüchternblutglukosewerte (7-stündige Nüchternperiode) der Mäuse wurden zweimal wöchentlich während des gesamten Beobachtungszeitraums von 28 Tagen gemessen. Blutproben wurden aus der Schwanzvene entnommen und mit einem tragbaren Blutglukosemesssystem analysiert.

6.3.4 Intraperitonealer Glukose Toleranz Test (IPGTT)

Ein intraperitonealer Glukose Toleranz Test (IPGTT) wurde 28 Tage nach der Zelltransplantation durchgeführt. Nach 7-stündigem Fasten wurde den Mäusen intraperitoneal eine 10%ige Glukoselösung (10 μ l/g Körpergewicht) injiziert. Der Blutglukosespiegel wurde nach 0, 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min an der Schwanzvene bestimmt und mit einem tragbaren Blutglukosemessgerät analysiert. Zur Bestimmung der Konzentrationen von Insulin und GCG im Plasma wurden die Tiere 15 min nach der Glukoseinjektion mit einer intraperitonealen Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach der Narkose wurde etwa 700 μ l Blut aus der Vena cava entnommen. Das Blut wurde in ein EDTA-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 14.000 xg zentrifugiert, um das Plasma zu isolieren. Das gewonnene Plasma wurde anschließend bei -80°C gelagert und für die weiteren ELISA-Messungen aufbewahrt.

6.3.5 GCG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Menge an ausgeschütteten GCG in Zellen, Inseln und PI, sowie im Plasma der transplantierten Mäuse wurde unter Verwendung des GCG Quantikine ELISA-Kits quantifiziert. Für die Bestimmung der GCG-Sekretion wurden 1×10^5 Zellen, zehn isolierte pankreatische Inseln oder zehn generierte PI für 1 h in KRB-Puffer (135 mmol/l NaCl, 3.6 mmol/l KCl, 5 mmol/l NaHCO₃, 0.5 mmol/l NaH₂PO₄, 0.5 mmol/l MgCl₂, 1.5 mmol/l CaCl₂ und 10 mmol/l HEPES, pH 7.4, BSA (0.1%)) mit 25 mmol/l Glukose inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die Zellen, Inseln oder PI wurden für 2 h in KRB-Puffer mit 0.5 mmol/l Glukose inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und zusammen mit den Plasma-Proben wurde die Sekretion von GCG unter Verwendung des spezifischen ELISA-Kits gemäß dem Herstellerprotokoll

bestimmt. Hierfür wurden Doppelbestimmungen jeder Probe auf die ELISA-Platte aufgetragen und für 3 h bei RT inkubiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden in die Wells kaltes GCG-Konjugat gegeben, das monoklonale Antikörper gegen GCG beinhaltete, die mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert waren. Die ELISA-Platte wurde für 1 h bei 2-8°C inkubiert. Die ELISA-Platte wurde anschließend für 30 min im Dunkeln mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Die Absorption bei 450 nm wurde dann mit Hilfe des Plattenlesegeräts PHOmo gemessen, und die Menge an GCG wurde anhand der Standardreihe bestimmt.

6.3.6 Insulin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Analog zu Abschnitt 6.3.4 wurde auch das ausgeschüttete Insulin in Zellen, pankreatischen Inseln und PI, sowie im Plasma der transplantierten Mäuse untersucht. Im Gegensatz zur GCG-Sekretion wurden 1×10^5 Zellen, zehn isolierte pankreatische Inseln oder zehn generierte PI zunächst für 1 h im glukosefreien KRB-Puffer und anschließend für 1 h in KRB-Puffer mit 25 mmol/l Glukose inkubiert. Nach dem Sammeln der Überstände wurde der Rat Insulin ELISA-Kit für die Quantifizierung verwendet. Zunächst wurden die Proben in Doppelbestimmung auf die ELISA-Platte aufgetragen und 2,5 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Überstände erfolgte eine Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper für 1 h, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit HRP-gekoppeltem Streptavidin für 45 min auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde die Reaktion für 30 min mit TMB-Substrat im Dunkeln entwickelt und durch Zugabe der Stopp-Lösung gestoppt. Die Absorption bei 450 nm wurde schließlich mit dem PHOmo-Plattenlesegerät gemessen, um die Insulinmenge anhand der Standardkurve zu berechnen.

6.4 Statistische Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Einzelwerte gemittelt, wobei die Normierung dieser Ergebnisse mithilfe von Microsoft Excel durchgeführt wurde. Die graphische Darstellung sowie die statistische Auswertung erfolgten daraufhin mithilfe

der Software Graph Pad Prism 8. Zur Untersuchung des Vergleichs zwischen zwei Gruppen kam der Student's t-Test zum Einsatz, während Unterschiede zwischen mehreren Gruppen durch die Anwendung von one-way ANOVA und dem Tukey-Posthoc-Test analysiert wurden.

7. Ergebnisse

7.1 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Viabilität von MIN6-Zellen

Das Hauptziel der ersten Experimente bestand darin, die Wirkung der CK2-Hemmung, insbesondere durch CX-4945, im Vergleich zu einem neuartigen Hemmstoff, dem SGC-CK2-1 mit erhöhter Spezifität für die Insulin-Expression und -Sekretion in einem Zell-Modell zu untersuchen. Dabei war es wesentlich, auch die Zellviabilität zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte spezifisch sind und nicht durch eine allgemeine Beeinträchtigung der Zellgesundheit verursacht werden. In diesem Kontext zeigten bereits die Studien von Lee et al. und Zakharia et al., dass eine Hemmung der CK2 die Lebensfähigkeit der Zellen beeinflussen kann (Lee et al., 2022; Zakharia et al., 2019). Daher wurde zunächst die Viabilität der Beta-Zelllinie MIN6 nach CK2-Inhibition untersucht. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1 und 10 μM) von CX-4945 oder SGC-CK2-1 behandelt, und nach 24 h wurde die Zellviabilität mittels der Zugabe des Farbstoffs Trypanblau gemessen (Abb. 3A). Nach 24 h verzeichnete lediglich die Behandlung mit 10 μM CX-4945 oder SGC-CK2-1 eine signifikante Reduktion der Viabilität. Zusätzlich wurde ein WST-Assay durchgeführt, der Aufschluss über die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität in MIN6-Zellen nach CK2-Inhibition gibt. Die Behandlung mit CX-4945 beeinflusste die Lebensfähigkeit der Zellen nicht. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit 10 μM SGC-CK2-1 zu einer Reduktion der Viabilität auf etwa 85% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3B). Beide Assays zeigten somit, dass sowohl CX-4945 als auch SGC-CK2-1 bei einer Konzentration von 10 μM einen geringen negativen Einfluss auf die Viabilität und Proliferation von MIN6-Zellen ausüben.

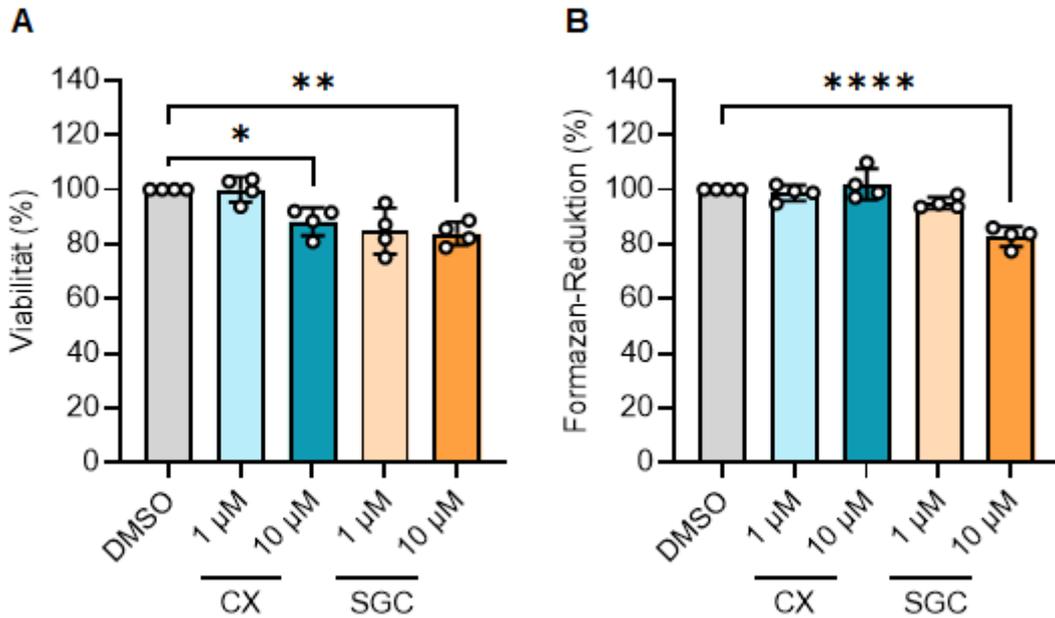


Abbildung 3: WST und LDH-Assay von MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 1 und 10 µM) oder SGC-CK2-1 (SGC, 1 und 10 µM) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Nach 24 h wurde das Viabilitäts-Assay (A) und das WST-Assay (B) durchgeführt. Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=4). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 gegen DMSO. MW ± SD.

7.2 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die CK2 Aktivität

Da die verwendeten Konzentrationen der Hemmstoffe nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausüben, wurde weiterhin untersucht, ob eine CK2-Inhibition die Expression von CK2α und CK2β beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden MIN6-Zellen mit CX-4945 (1 und 10 µM) oder SGC-CK2-1 (1 und 10 µM) behandelt. Nach 24 h wurden Extrakte generiert, um die Protein-Expression der beiden CK2-Untereinheiten zu untersuchen. Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass weder CX-4945 noch SGC-CK2-1 einen Einfluss auf die Protein-Expression von CK2α und CK2β aufweisen (Abb. 4).

Ergebnisse

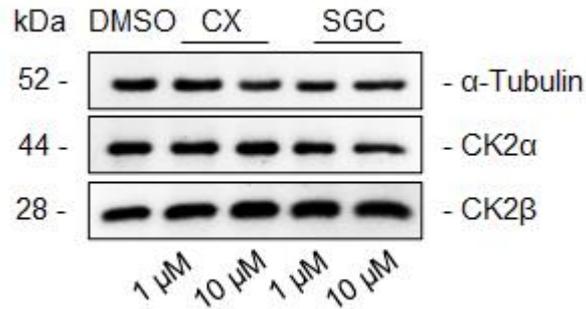


Abbildung 4: Protein-Expression von α -Tubulin, CK2 α und CK2 β in MIN6-Zellen. Repräsentativer Western Blot. MIN6-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 1 und 10 μ M) oder SGC-CK2-1 (SGC, 1 und 10 μ M) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Nach 24 h wurde die Expression der CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Inhibition die Protein-Expression der CK2-Untereinheiten nicht beeinflusst, wurde überprüft, ob es zu einer reduzierten CK2-spezifischen Phosphorylierung an Serin129 von Akt führt und somit zu einer verringerten CK2 Kinase Aktivität. Hierfür wurden MIN6-Zellen analog zu den bisherigen Experimenten behandelt, und nach Generierung der Extrakte wurde die Protein-Expression von Akt sowie die Phosphorylierung von Akt S129 mit einem phosphospezifischen Antikörper untersucht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Konzentration von 10 μ M CX-4945 zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung führt. Die Behandlung der MIN6-Zellen mit SGC-CK2-1 hingegen bewirkte bereits ab einer Dosis von 1 μ M eine deutliche Reduktion (Abb. 5A). Ebenfalls wurde ein *in vitro* CK2-Phosphorylierungsassay durchgeführt, indem Zellextrakte mit [γ - 32 P]-ATP und dem synthetischen CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD inkubiert wurden (Marin et al., 1994). Nach der Kinasereaktion wurde das in das Peptid eingebaute markierte Phosphat durch Čerenkov-Zählung bestimmt. Das Ergebnis in Abbildung 5B zeigte deutlich, dass beide Inhibitoren die CK2 Aktivität signifikant reduzieren konnten. Eine Dosis von 1 μ M CX-4945 führte zu einer Reduktion von etwa 60%, die höheren Konzentrationen verringerten die CK2 Aktivität um weitere 20%.

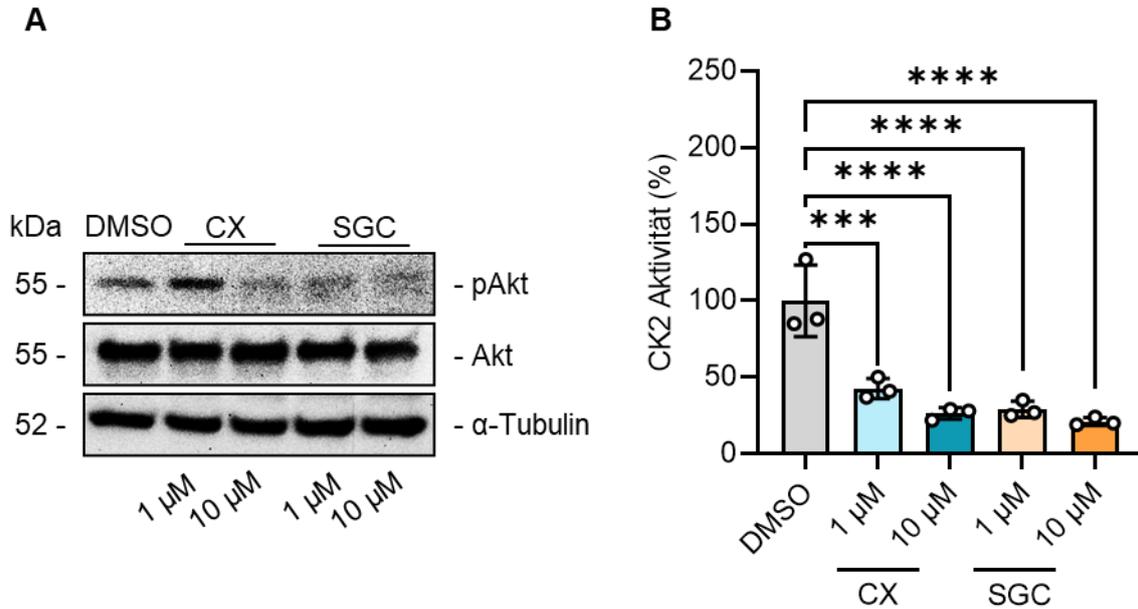


Abbildung 5: Protein-Expression von pAkt, Akt und CK2 Aktivität in MIN6-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot. MIN6-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 1 und 10 μ M) oder SGC-CK2-1 (SGC, 1 und 10 μ M) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Nach 24 h wurde die Expression von pAkt, Akt und α -Tubulin mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin, als Kontrolle der Phosphorylierung wurde gesamt Akt verwendet. (B) MIN6-Zellextrakte wurden mit [³²P]ATP und dem synthetischen CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD inkubiert (Das Experiment wurde von C. Götz durchgeführt). Nach der Kinasereaktion wurde das in das Peptid eingebaute markierte Phosphat mittels Čerenkov-Zählung gemessen. Die Aktivität, die in den Kontrollextrakten (DMSO) gemessen wurde, wurde als 100% gesetzt, und die Aktivität der behandelten Extrakte wurde relativ dazu berechnet (n=3). ***p< 0,001, ****p<0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD.

7.3 Einfluss von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Insulinproduktion und -sekretion

Aufgrund der ähnlichen Reduktion der CK2-Kinase-Aktivität durch SGC-CK2-1 und CX-4945 wurde der Einfluss auf die Insulin-Expression und -Sekretion genauer untersucht. Bekanntlich führt die Inhibition von CK2 durch CX-4945 zu einer erhöhten Insulin-Expression. Scheuer et al. konnten zudem zeigen, dass die Behandlung der Beta-Zelllinie INS-1 mit CX-4945 eine gesteigerte Insulin-Sekretion bewirkt (Scheuer et al., 2020). Daher wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss verschiedener Konzentrationen von CX-4945 und SGC-CK2-1 auf die Insulin-Expression analysiert. Zu diesem Zweck wurden MIN6-Zellen für 24 h mit CX-4945 oder SGC-CK2-1 behandelt, und Zelllysate wurden für qRT-PCR und Western Blot generiert. Wie in Abbildung 6A zu sehen ist, bewirkt die Zugabe beider CK2 Inhibitoren eine Verdopplung der Pro-Insulin mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob diese erhöhte mRNA-Expression sich ebenfalls

in der Protein-Expression der Vorläuferform des Insulins, dem Pro-Insulin, widerspiegelt. Obwohl eine Dosis von 10 μM SGC-CK2-1 eine signifikant erhöhte Pro-Insulin-Expression bewirkte, zeigten die übrigen Behandlungen jeweils nur eine minimale Steigerung der Protein-Expression, insbesondere im Vergleich zur mRNA-Expression (Abb. 6C).

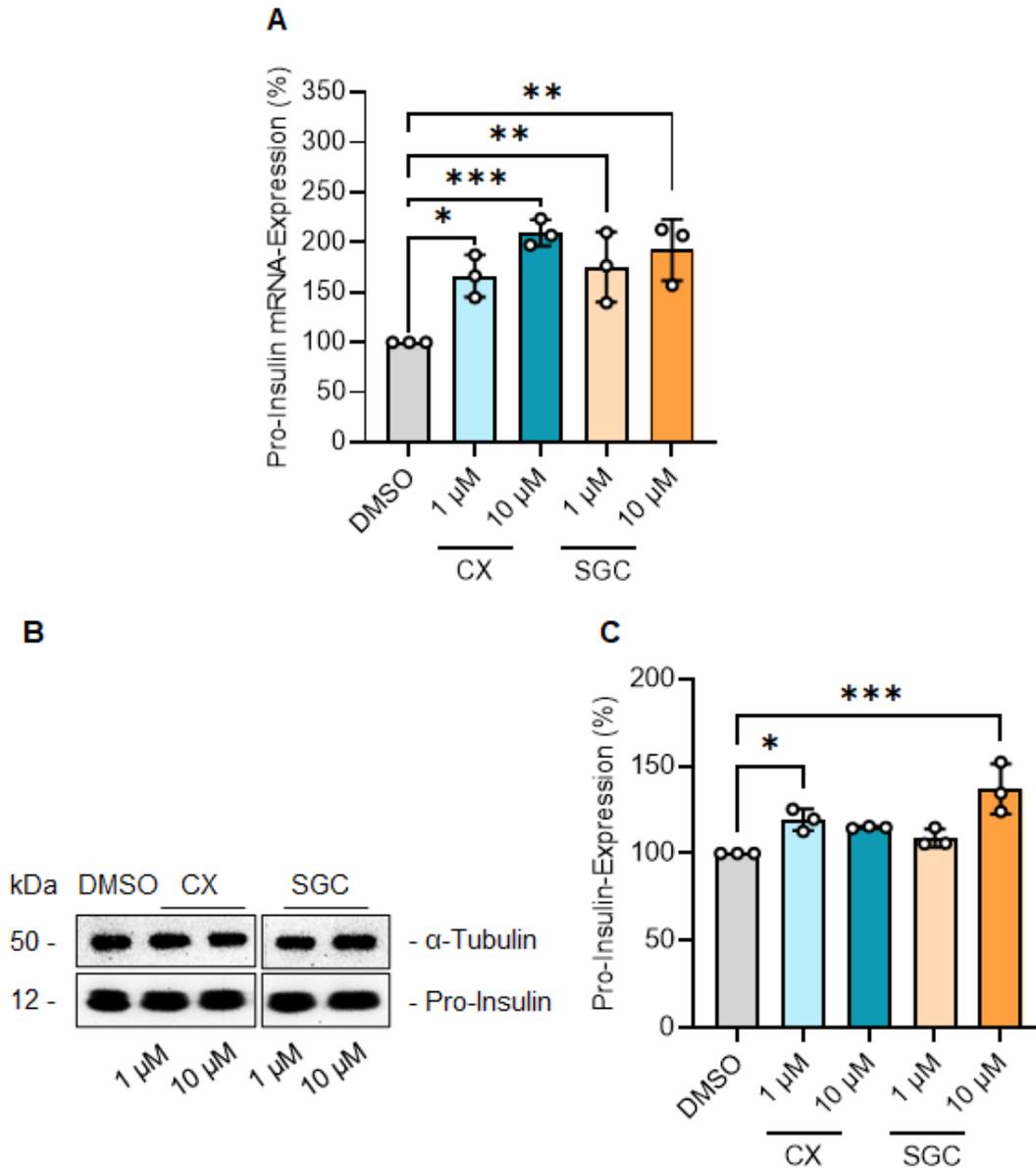


Abbildung 6: mRNA- und Protein-Expression von Insulin in MIN6-Zellen. (A) Quantitative Auswertung der qRT-PCRS. Analysiert wurde die Pro-Insulin mRNA Expression in MIN6-Zellen nach Behandlung mit CX-4945 (CX, 1 und 10 μM), SGC-CK2-1 (SGC, 1 und 10 μM) für 24 h. Als Kontrolle diente DMSO. Nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH, wurden die DMSO behandelten Zellen auf 100% gesetzt. (B) Repräsentativer Western Blot. MIN6-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 1 und 10 μM) oder SGC-CK2-1 (SGC, 1 und 10 μM) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Nach 24 h wurde die Expression von Pro-Insulin analysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. (C) Quantitative Auswertung der Western Blots. Analysiert wurde die Pro-Insulin Expression von (B). Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ gegen DMSO. MW \pm SD.

Eine Diskrepanz zwischen erhöhter mRNA-Expression und unveränderter Protein-Expression kann auftreten, wenn das neu synthetisierte Protein schnell aus der Zelle ausgeschleust wird. Dies kann dazu führen, dass der intrazelluläre Proteinspiegel trotz erhöhter mRNA-Expression konstant bleibt oder sinkt. Zur Überprüfung dieser Hypothese zu überprüfen, wurden im folgenden Experiment MIN6-Zellen mit 10 μM CX-4945 oder SGC-CK2-1 behandelt, da Vorexperimente gezeigt hatten, dass 1 μM SGC-CK2-1 nur zu einer geringen Veränderung der Sekretion führte. Nach der Behandlung mit beiden Inhibitoren konnte eine signifikante Steigerung der Insulin-Sekretion um das 1,5-fache festgestellt werden (Abb. 7).

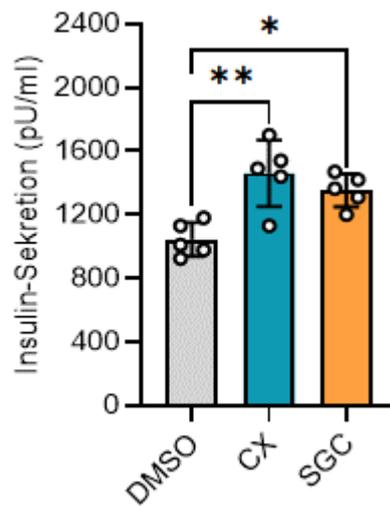


Abbildung 7: Insulin-Sekretion von MIN6-Zellen. Quantitative Analyse der Insulin-Sekretion von MIN6-Zellen nach Behandlung mit CX-4945 (10 μM) oder SGC-CK2-1 (10 μM). Als Kontrolle diente DMSO: Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in pU/ml dargestellt (n = 5). *p<0,05, **p<0,01 gegen DMSO. MW \pm SEM.

Die vorherigen Experimente zeigten, dass eine Inhibition der CK2 sowohl durch den etablierten CK2-Inhibitor CX-4945 als auch durch den neuen, selektiveren Inhibitor SGC-CK2-1 die Insulin-Expression und -Sekretion vergleichbar positiv beeinflusst. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass beide Inhibitoren effektiv die CK2-Aktivität hemmen und damit die Insulinproduktion und -freisetzung in Beta-Zellen steigern können.

Diese Erkenntnisse haben bedeutende Auswirkungen auf die Planung der nächsten Experimente. Da SGC-CK2-1 ein selektiverer Inhibitor ist, bietet er die Möglichkeit, spezifischere Einsichten in die Rolle von CK2 bei der Regulation der Insulin-Expression zu gewinnen, während potenzielle Off-Target-Effekte, die mit weniger

selektiven Inhibitoren wie CX-4945 auftreten könnten, minimiert werden. Im nächsten Schritt soll der Einfluss der CK2-Inhibition oder des Verlusts von CK2 auf die Regulation der GCG-Expression in α TC1-Zellen untersucht werden. Hierzu werden sowohl SGC-CK2-1 als auch CX-4945 in den Experimenten verwendet, um zu bestimmen, wie die Hemmung von CK2 die Glucagon-Expression in diesen Zellen beeinflusst.

7.4 Die Zelllinien α TC1 und MIN6 im Vergleich

Um eine CK2-vermittelte Regulation der GCG-Expression zu erforschen, wurden die bereits etablierten Zelllinien MIN6, sowie α TC1 verwendet (Abb. 8). Die Beta-Zelllinie MIN6 wurde aus einem Insulinom einer transgenen Maus isoliert, welche das T-Antigen von SV40 in ihren Beta-Zellen exprimiert. Diese Zelllinie ähnelt morphologisch den nativen Beta-Zellen einer pankreatischen Insel und weist eine vergleichbare Glukose-induzierbare Insulin-Sekretion auf (Ishihara et al., 1993). Diese Zelllinie diente als Negativkontrolle für die GCG-Studien. Analog dazu stammen die GCG-produzierenden α TC1-Zellen ebenfalls aus einem Insulinom einer Maus ab, diese exprimieren wiederum das SV40 T-Antigen-Onkogen unter der Kontrolle des Ratten-PreproGCG-Promotors. Die GCG mRNA-Expression ist hierbei um das 5 bis 10fache im Vergleich zu nativen pankreatischen Inseln erhöht (Powers et al., 1990).

Um sicherzustellen, dass die α TC1-Zelllinie ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf Glucagon-exprimierende Zellen darstellt, wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt. In diesem Vorversuch wurden die Zelllinien MIN6 und α TC1 miteinander verglichen. Hierfür wurden unbehandelte Zellen geerntet, und aus ihnen wurden Extrakte für qRT-PCR und Western Blot generiert. Die Analyse der Genexpression in Abbildung 8A und B ergab, dass die Zelllinien keine mRNA für den jeweiligen Antagonisten exprimieren. Die Bestätigung dieser Beobachtung erfolgte durch den Western Blot in Abbildung 8C, der zeigte, dass die Zelllinien entweder Insulin oder GCG exprimierten, jedoch nicht beides. In beiden Zelllinien wurde auch die Expression der CK2-Untereinheiten α und β analysiert.

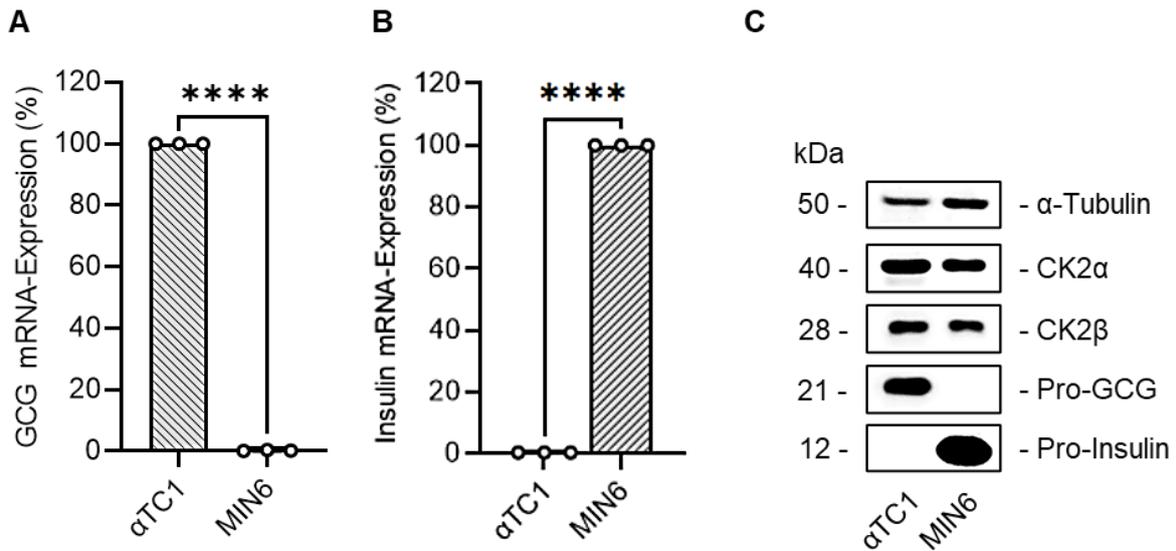


Abbildung 8: mRNA-Expression von GCG und INS1, sowie Protein-Expression von CK2 α -, CK2 β -, Pro-GCG- und Pro-Insulin in α TC1- und MIN6-Zellen. Quantitative Auswertung der GCG (A) und Insulin (B) mRNA-Expression von α TC1- und MIN6-Zellen. Die Daten von α TC1 (a) oder MIN6 (B) wurden auf 100% gesetzt (n = 3). ****p<0,0001 gegen α TC1 (A) und MIN6 (B). MW \pm SD. (C). Repräsentativer Western Blot. Analysiert wurde die Expression von α -Tubulin, CK2 α , CK2 β , Pro-GCG und Pro-Insulin in α TC1- und MIN6-Zellen. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieses Experiments kann die α TC1-Zelllinie als geeignet betrachtet werden, um den Einfluss der CK2-Inhibition auf die Regulation der GCG-Expression zu untersuchen. Dies gilt insbesondere, da die Zelllinie ausschließlich GCG sowie die CK2-Untereinheiten α und β exprimiert, wodurch störende Einflüsse durch Insulin ausgeschlossen werden.

7.5 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die CK2 Protein- und mRNA-Expression

Da bei den verwendeten Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 Off-Target-Effekte im Modellsystem der α TC1-Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden können, wurde zusätzlich ein Knockout mittels der CRISPR/Cas9-Methode erstellt, bei dem die katalytische CK2 α -Untereinheit ausgeschaltet wurde (α TC1 CK2 α KO-Zellen). Somit konnte nicht nur die Hemmung der CK2 mit Hilfe der Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 untersucht werden, sondern es wurde auch der Effekt des Verlusts der α -Untereinheit auf die Regulation von GCG untersucht. Hierfür wurden α TC1-Zellen für

24 h mit den Inhibitoren CX-4945 (10 μ M), SGC-CK2-1 (10 μ M), sowie DMSO als Lösemittelkontrolle behandelt. Nach 24 h wurden die behandelten Zellen, als auch unbehandelte α TC1 CK2 α KO-Zellen geerntet und die Zellextrakte wurden für Western Blots verwendet, um die Protein-Expression der CK2 α bzw. CK2 β -Untereinheiten, pAkt, Akt und GAPDH zu untersuchen (Abb. 9A). Die Anwendung der beiden Inhibitoren hatte nur eine geringfügige Auswirkung auf die CK2-Protein-Expression, was bereits in den vorherigen Experimenten mit MIN6-Zellen bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu unterdrückte der Knockout der katalytischen CK2 α -Untereinheit in den α TC1 CK2 α KO-Zellen sowohl die CK2 α -Gen- als auch die Protein-Expression und führte zu einer signifikanten Reduktion des CK2 β -Proteinniveaus (Abb. 9B-D). Nachdem eine CK2 Inhibition und Knockout der katalytischen Untereinheit sich unterschiedlich auf die Protein-Expression der CK2-Untereinheiten auswirkte, wurde ebenfalls untersucht, ob diese Veränderungen eine direkte Auswirkung auf die katalytische Aktivität der CK2 zeigen. Dazu wurde die Phosphorylierung von Akt an Serin 129, einer spezifischen CK2-Phosphorylierungsstelle, untersucht. Wie erwartet, wurde keine Akt-Phosphorylierung in den mit CX-4945 und SGC-CK2-1 behandelten α TC1-Zellen sowie in den α TC1 CK2 α KO-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt (Abb. 9E).

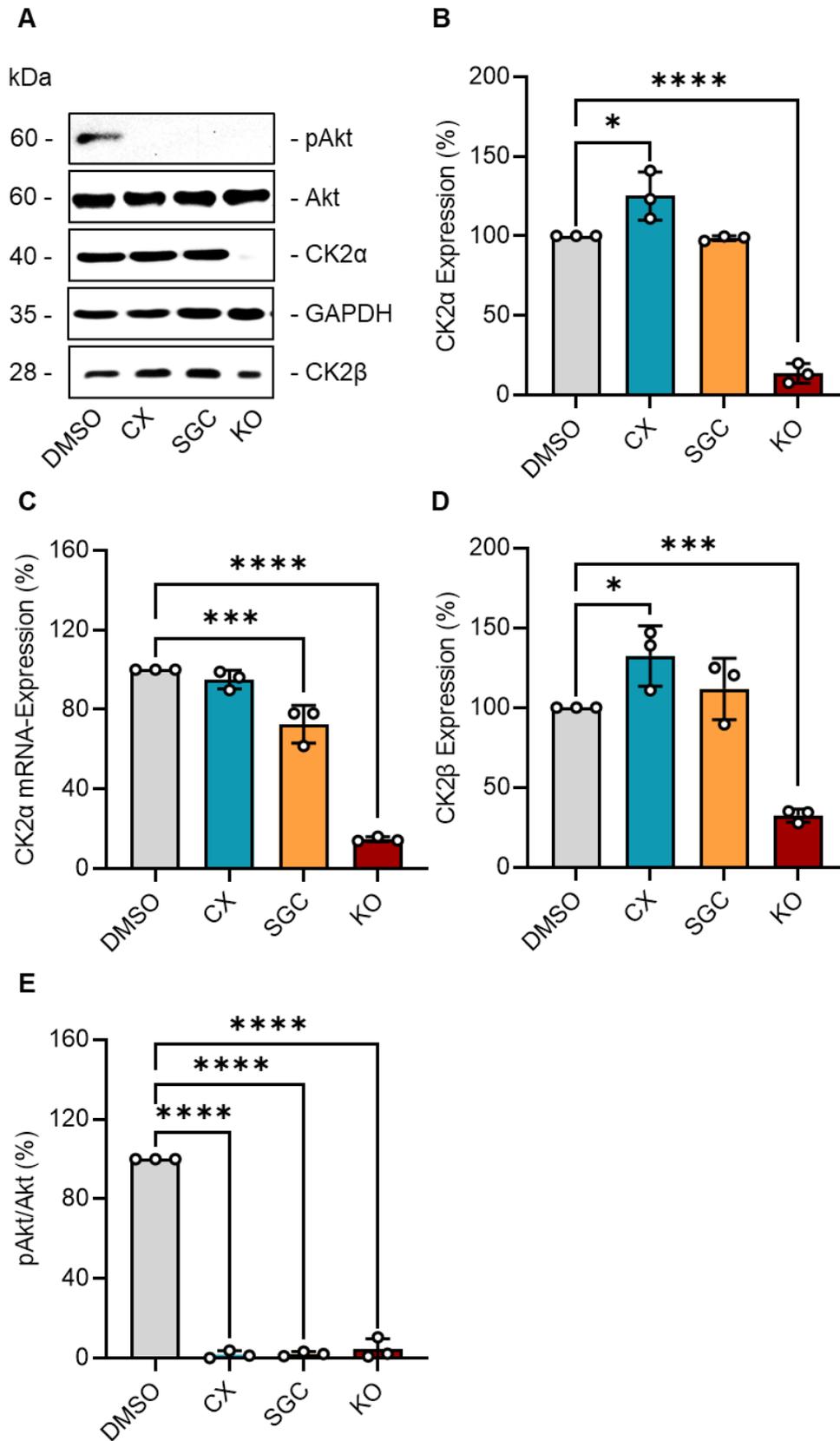


Abbildung 9: Protein-Expression von pAkt, Akt, CK2α, und CK2β in behandelten αTC1- und αTC1 CK2α KO-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot. αTC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μM) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μM) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Protein-Expression von pAkt, Akt,

CK2 α , und CK2 β in behandelten α TC1- und α TC1 KO-Zellen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Quantitative Auswertung der Western Blots von (A). Analysiert wurde die CK2 α - (B), CK2 β (D), sowie pAkt/Akt-Expression (E). Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). *p< 0,05, ***p< 0,001, ****p<0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD. (C) Quantitative Auswertung der qRT-PCRS. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die CK2 α mRNA-Expression in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH, wurden die DMSO-behandelten Zellen auf 100% gesetzt. (n = 3). ***p< 0,001, ****p< 0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD.

7.6 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Proliferation und Viabilität

Da CK2 eine essentielle Kinase ist, die an der Zellproliferation beteiligt ist, könnten eine verringerte Aktivität oder der Knockout der CK2 α -Untereinheit negative Auswirkungen auf die Viabilität der α TC1-Zellen haben. Um dies zu überprüfen, wurden in den folgenden Experimenten die Zellproliferation und die zelluläre Viabilität untersucht (Abb. 10). Für das WST- und LDH-Assay wurden die α TC1-Zellen und α TC1 CK2 α KO-Zellen ausgesät und die α TC1-Zellen wurden zusätzlich mit CX-4945 (10 μ M) oder SGC-CK2-1 (10 μ M), sowie DMSO für 24 h behandelt. Die Inhibition der CK2 mit CX-4945 sowie SGC-CK2-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, während ein Knockout der katalytischen Untereinheit keine Veränderung zeigte (Abb. 10A). Die Formazan-Bildung nach CX-4945-Behandlung wurde um etwa 10% reduziert, wohingegen die Applikation von SGC-CK2-1 die Formazan-Bildung um die Hälfte reduzierte. Im Gegensatz dazu, wurde beim LDH-Assay lediglich eine Veränderung der LDH-Freisetzung nach der Behandlung der α TC1-Zellen mit SGC-CK2-1 festgestellt (Abb. 10B).

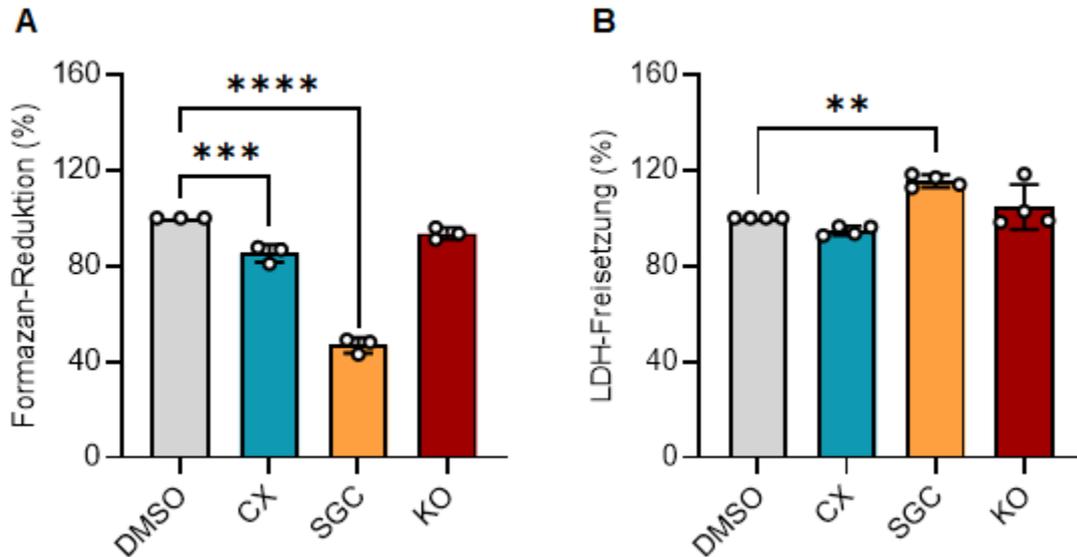


Abbildung 10: Formazan-Reduktion und LDH-Freisetzung in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Formazan-Reduktion (**A**) und die LDH-Freisetzung (**B**) in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (A: n=3; B: n=4). **p< 0,01, ***p< 0,001, ****p< 0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD.

Zusätzlich zu diesen Assays wurden Wachstumskurven von α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen erstellt, sowie die Viabilität der Zellen überprüft. Hierfür wurden α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen ausgesät. Die α TC1-Zellen wurden zusätzlich mit CX-4945 (10 μ M) und SGC-CK2-1 (10 μ M), sowie DMSO behandelt. Die Zellzahl wurde an Tag 0-3 nach Aussaat gemessen. Die Viabilität wurde am dritten Tag gemessen. Hierbei führten sowohl die pharmakologische Hemmung als auch der Knockout von CK2 α zu einer Reduktion der Proliferation und Viabilität von α TC1-Zellen (Abb. 11A und B).

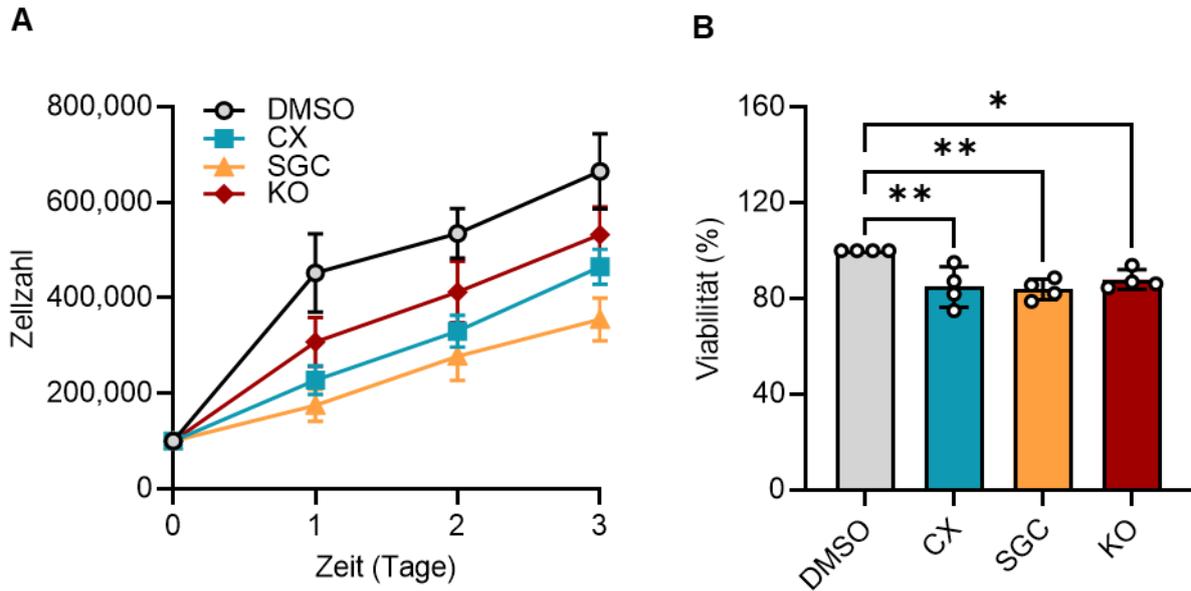


Abbildung 11: Proliferation und Viabilität in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Zellzahl (**A**) nach 24 h, 48 h und 72 h, sowie die Viabilität (**B**) nach 72 h in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen (A: n=4; B: n=4). *p< 0,05, **p< 0,01 gegen DMSO. MW \pm SD.

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass sowohl die Inhibition als auch der Knockout von CK2 α geringe negative Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Lebensfähigkeit der α TC1-Zellen haben. Da der Effekt der Hemmstoffe auf die Zellviabilität nicht so stark ist, dass er die Ergebnisse der Experimente erheblich beeinflusst, werden in den folgenden Untersuchungen weiterhin dieselben Konzentrationen verwendet. Der Fokus wird dabei jedoch weniger auf der Zellviabilität liegen; stattdessen wird die Untersuchung verstärkt auf anderen Aspekten, wie den Auswirkungen auf die Glucagon-Expression und die Regulation des Glucagon-Promoters, gerichtet sein.

7.7 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Expression und -Sekretion

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine CK2 Inhibition die Expression der CK2 nur geringfügig beeinflusst, während ein Knockout die CK2-Expression vollständig unterdrückt. Zudem zeigten die darauffolgenden Assays, dass sowohl eine CK2 Inhibition als auch ein Knockout von CK2 α zu einer leichten Reduktion der Proliferation und Viabilität von α TC1-Zellen führt. Aufgrund dieser Ergebnisse werden sowohl das Modellsystem als auch die Konzentrationen der Inhibitoren als geeignet betrachtet, um im nächsten Abschnitt den Einfluss der CK2 auf die Pro-GCG-Expression und -Sekretion zu untersuchen. Hierfür wurden α TC1-Zellen mit CX-4945 (10 μ M), SGC-CK2-1 (10 μ M) sowie DMSO behandelt. Zell-Extrakte für qRT-PCR, Western Blots und ELISA wurden sowohl aus diesen behandelten Zellen als auch aus α TC1 KO-Zellen hergestellt (Abb. 12).

In der Tat führte die Exposition von α TC1-Zellen gegenüber CX-4945 und SGC-CK2-1 sowie der Knockout von CK2 α zu einer deutlich verringerten Pro-GCG-Expression (Abb. 12A und B). Da eine verringerte Protein-Expression nicht immer direkt zu einer reduzierten Sekretion führt, wurde im Folgenden ein ELISA zum Nachweis der GCG-Sekretion durchgeführt. Dieser bestätigte, dass die reduzierte Protein-Expression tatsächlich auch eine negative Auswirkung auf die GCG-Sekretion hat (Abb. 12C). Weitere qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Hemmung und der Knockout von CK2 α die GCG mRNA-Expression reduziert (Abb. 12D). Dies deutet darauf hin, dass CK2 höchstwahrscheinlich die GCG-Expression auf der Transkriptionsebene reguliert.

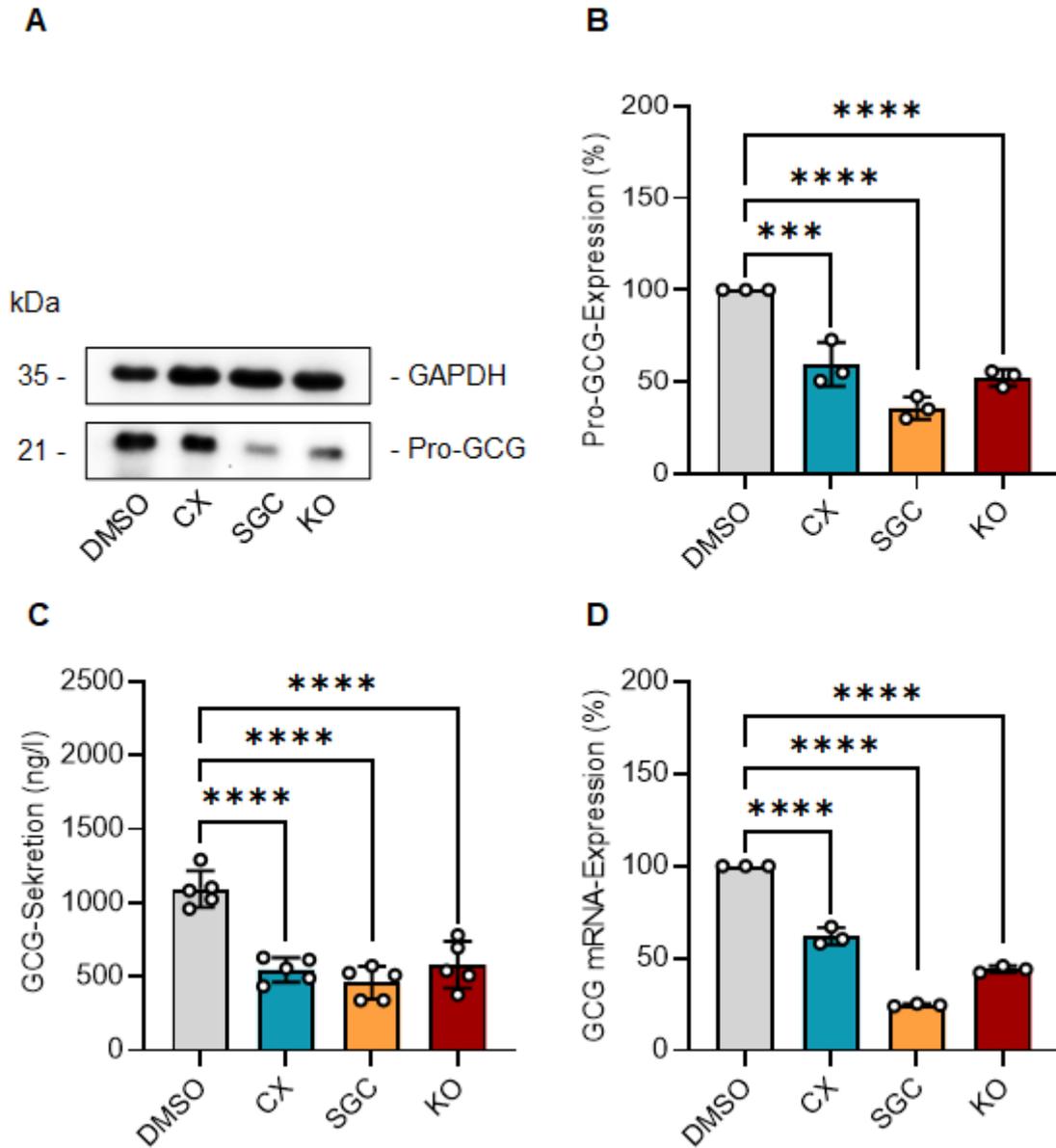
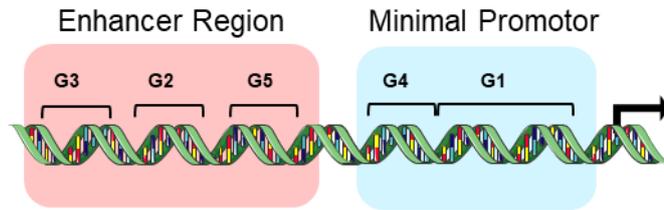


Abbildung 12: Protein- und mRNA-Expression, sowie Sekretion von GCG in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Protein-Expression von Pro-GCG in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (B) Quantitative Auswertung der Western Blots von (A). Analysiert wurde die Pro-GCG-Expression. Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). ***p< 0,001, ****p<0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD. (C) α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die GCG-Sekretion in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Als Kontrolle diente DMSO: Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in ng/l dargestellt (n = 5). ****p<0,0001 gegen DMSO. MW \pm SEM. (D) Quantitative Auswertung der qRT-PCRS. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die GCG mRNA-Expression in behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH, wurden die DMSO behandelten Zellen auf 100% gesetzt. (n = 3). ****p< 0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD.

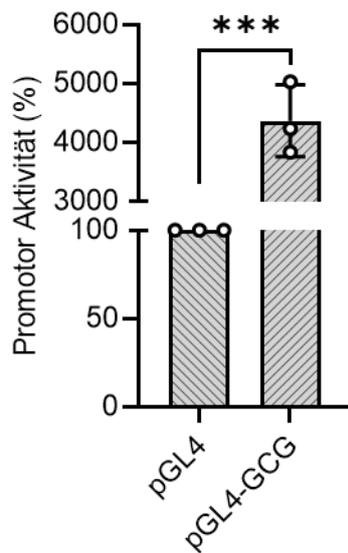
7.8 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Promotor Aktivität

Da die vorherigen Experimente auf eine Regulation der GCG-Expression auf der Transkriptionsebene hindeuten, wurde zur Identifizierung des zugrunde liegenden Mechanismus ein Luciferase-Reporter-Konstrukt erzeugt, das sowohl die Enhancer-Region als auch den Minimal-Promotor des murinen GCG-Promotors enthält (Abb. 13A). Mit Hilfe des Luciferase-Assays wurde die Aktivität des Promotors nach Transfektion der α TC1-Zellen mit diesem Konstrukt gemessen. Es konnte eine erhöhte Aktivität des pGL4-GCG-Konstrukts festgestellt werden (Abb. 13B), die jedoch bei pharmakologischer Hemmung der CK2 sowie in α TC1 CK2 α KO-Zellen um bis zu der Hälfte reduziert war (Abb. 13C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CK2 einen signifikanten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität des GCG-Promotors hat. Zur Analyse des Mechanismus, muss die Rolle spezifischer Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der GCG-Expression beteiligt sind, untersucht werden.

A



B



C

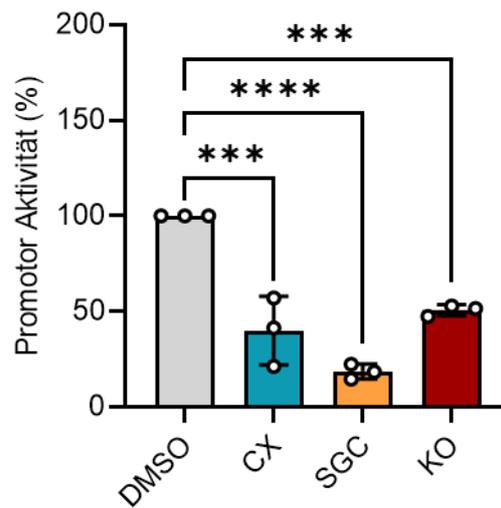


Abbildung 13: Luciferase-Assays von behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Enhancer Region (G3, G2 und G5) und des Minimal Promotors (G4 und G1) des GCG-Gens (Quelle: Ampofo et al., 2024, modifiziert). (B) α TC1-Zellen wurden mit pGL4-GCG oder pGL4 transfiziert. Nach 24 h wurde die Promotor Aktivität mittels Luciferase-Assay gemessen. Die pGL4-transfizierten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). ***p < 0,001 gegen pGL4. MW \pm SD. (C) α TC1-Zellen wurden mit pGL4-GCG oder pGL4 transfiziert und anschließend mit CX-4945 (CX, 10 μ M), SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) oder DMSO behandelt. Nach 24 h wurde die Promotor Aktivität mittels Luciferase-Assay von behandelten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen gemessen. Die DMSO-behandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). ***p < 0,001, ****p < 0,0001 gegen DMSO. MW \pm SD.

7.9 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die nucleäre Expression von PAX6 und MafB

Da die Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB bereits als Aktivatoren der GCG-Expression bekannt sind und am Minimal Promotor des GCG-Gens binden (Hill et al., 1999; M. C. Katoh et al., 2018; Sander et al., 1997), wurde im Folgenden untersucht, ob es nach Herunterregulation der CK2-Aktivität zu einer veränderten Expression der Transkriptionsfaktoren im Nucleus von α TC1-Zellen kommt. Um die subzelluläre Lokalisation von PAX6 und MafB zu untersuchen, wurden zytoplasmatische und nucleäre Proteinextrakte von α TC1 (WT)-Zellen sowie α TC1 CK2 α KO (KO)-Zellen gewonnen. Diese Extrakte wurden anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen, um die spezifische Verteilung der Proteine zu detektieren (Abb. 14B). Hierbei wurde eine vermehrte Lokalisation von MafB in der Zytoplasma-Fraktion in α TC1 CK2 α KO-Zellen beobachtet (Abb. 14C). Diese Zunahme im Zytoplasma führte zu einer verringerten Expression von MafB im Nucleus (Abb. 14D). Im Gegensatz dazu verzeichnete PAX6 keine veränderte Gen-Expression und Lokalisation im Vergleich zu WT-Zellen (Abb. 14E). Somit führt der Knockout von CK2 α zu einer veränderten Expression des aktivierenden Transkriptionsfaktors MafB im Zellkern, was sich möglicherweise negativ auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren am GCG-Promotor auswirkt.

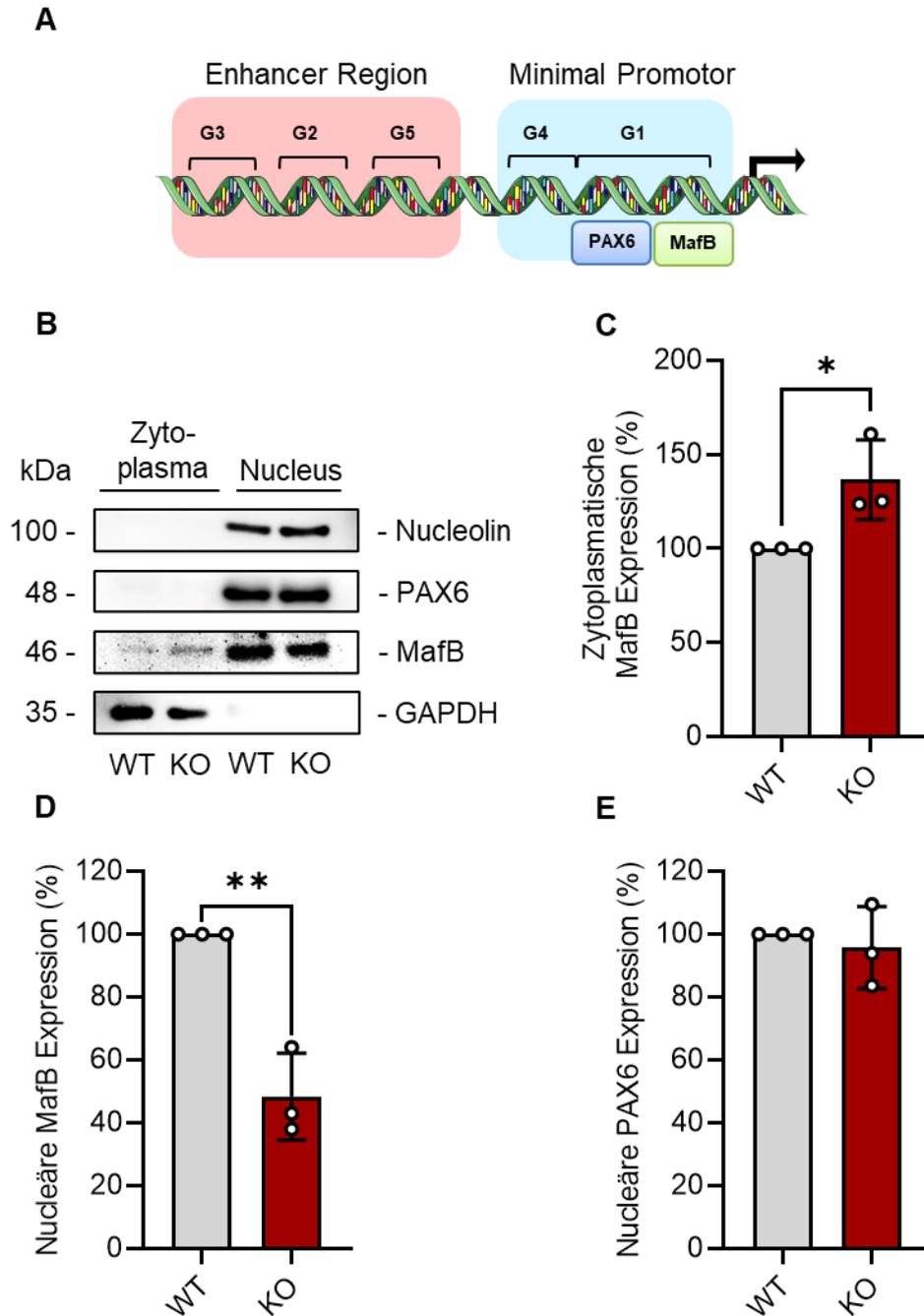


Abbildung 14: Protein-Expression und subzellulären Lokalisation von PAX6 und MafB in α TC1(WT)- und α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Bindung von PAX6 und MafB an das G1-Element des GCG-Promotors, welcher aus den Elementen G1-G5 besteht. Die Elemente G2, G3 und G5 bilden die Enhancer Region, die Elemente G1 und G4 bilden den Minimal Promotor (Quelle: Ampfo et al., 2024, modifiziert). (B) Zytoplasmatische und nucleäre Proteinextrakte von α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen wurden generiert. Analysiert wurde die Protein-Expression von PAX6 und MafB. Als Ladekontrolle für die zytoplasmatischen Extrakte wurde GAPDH verwendet, während Nucleolin als Ladekontrolle für die nucleären Extrakte diente. Quantitative Analyse der zytoplasmatischen (C) und nucleären (D) MafB Expression, sowie der nucleären PAX6-Expression (E) von (B). Die Expression von α TC1-Zellen wurde auf 100% gesetzt (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01 gegen WT. MW \pm SD.

7.10 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die Bindung von MafB und PAX6 an den GCG-Promotor

Zur Untersuchung, ob der Knockout der katalytischen Untereinheit der CK2 α die Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren MafB und PAX6 am GCG-Promotor beeinflusst, wurde ein DNA-Pull-Down-Assay mit nucleären Zellextrakten von α TC1- und α TC1 CK2 KO-Zellen durchgeführt und mittels Western Blot-Analyse die Bindung von MafB und PAX6 an den GCG-Promoter überprüft. Wie erwartet, banden MafB und PAX6 in α TC1-Zellen an den Promotor, jedoch war diese Bindung in α TC1 CK2 α KO-Zellen deutlich reduziert (Abb. 15A und B). Diese reduzierte Bindung von MafB und PAX6 könnte zu einer veränderten Anordnung von weiteren Transkriptionsfaktoren an den GCG-Promoter resultieren, besonders von solchen die direkt von CK2 phosphoryliert werden.

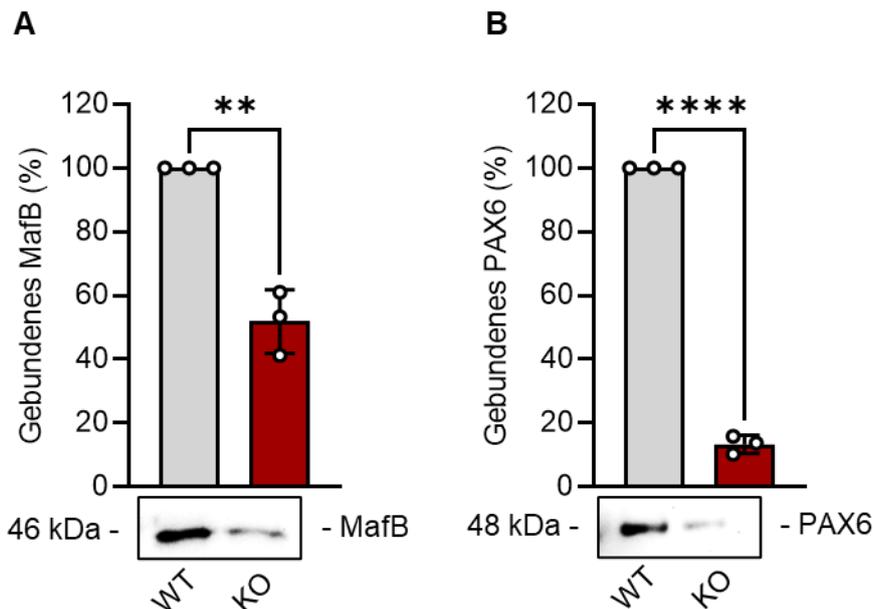


Abbildung 15: Pull-Down-Assay von MafB und PAX6 in α TC1(WT)- und α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen
 Repräsentative Western Blots von MafB (A, unten) und PAX6 (B, unten) der DNA-Pull-Down-Assays von α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. Quantitative Analyse von MafB (A, oben) und PAX6 (B, oben) der Western Blots. Die α TC1-Zellen wurden auf 100% gesetzt. (n=3) **p< 0.01, ***p< 0.001 gegen WT. MW \pm SD

7.11 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die nucleäre Expression von PDX1

Ein Transkriptionsfaktor, der für diese neue Anordnung der Bindungspartner am GCG-Promoter verantwortlich sein könnte, ist PDX1. Frühere Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass CK2 das murine PDX1 an den Aminosäureresten Threonin231 und Serin232 phosphoryliert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der CK2-abhängigen Phosphorylierung die Expression des PDX1-Proteins in Beta-Zellen stabilisiert und erhöht (Klein et al., 2017; Spohrer et al., 2017). PDX1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung pankreatischer Zellen zu Alpha-Zellen (Wang et al., 2001). In reifen Alpha-Zellen hingegen ist PDX1 nicht mehr vorhanden. Wenn PDX1 aktiv ist, hemmt es die Funktionen der Alpha-Zelle, insbesondere die Synthese von GCG (Ritz-Laser et al., 2003).

Um zu überprüfen, ob der Transkriptionsfaktor PDX1 auch in pankreatischen Alpha-Zellen unter Einwirkung von CK2-Inhibitoren eine regulierende Funktion hat, wurden α TC1-Zellen ausgesät und für 24 h mit CX-4945 oder SGC-CK2-1 behandelt. Anschließend wurde aus den behandelten α TC1-Zellen sowie aus α TC1 CK2 α KO-Zellen eine Zytoplasma-Kern-Fraktionierung durchgeführt und mittels Western Blot analysiert.

Obwohl Alpha-Zellen des Pankreas von Natur aus sehr niedrige PDX1-Konzentrationen aufweisen, da PDX1 primär als Aktivator der Insulin-Expression fungiert und für die Aufrechterhaltung der Zellidentität von Beta-Zellen zuständig ist, indem es das Genprogramm von Alpha-Zellen unterdrückt (Ebrahim et al., 2022; Gao et al., 2014; Zhu et al., 2017), konnte in einem folgenden Experiment eine erhöhte Protein-Expression von PDX1 in der nuclearen Fraktion nach CK2-Hemmung oder Knockout der CK2 α beobachtet werden (Abb. 16A und B).

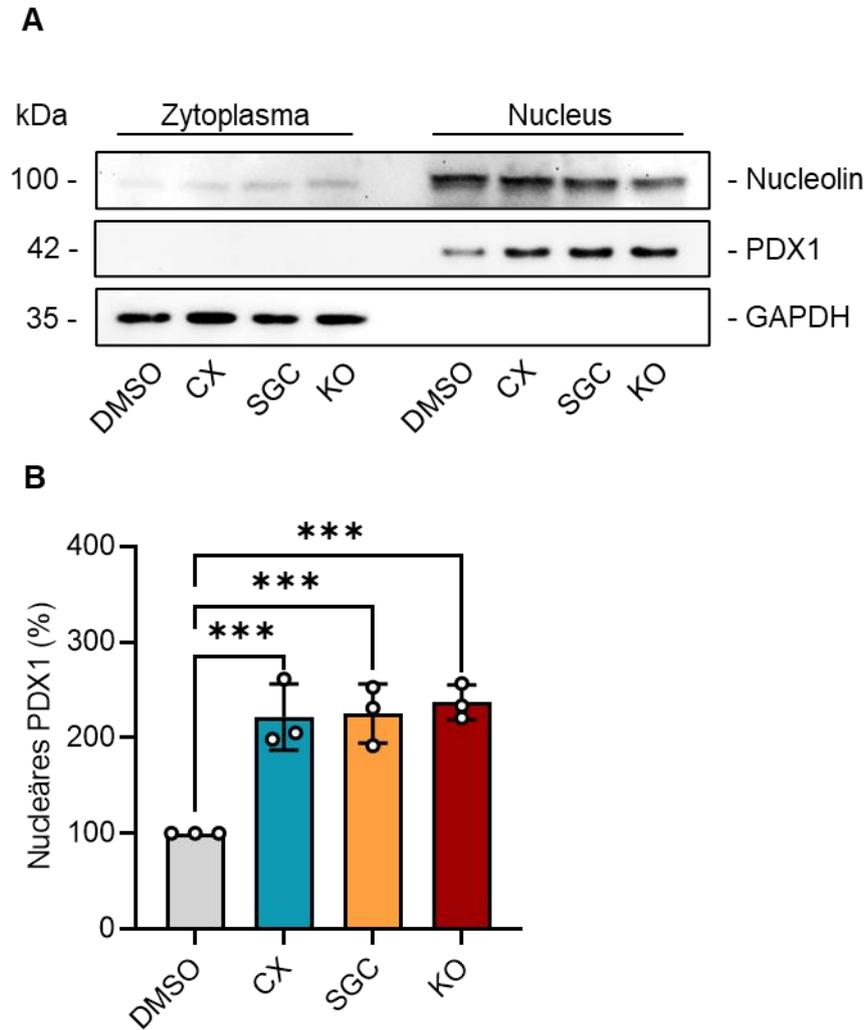
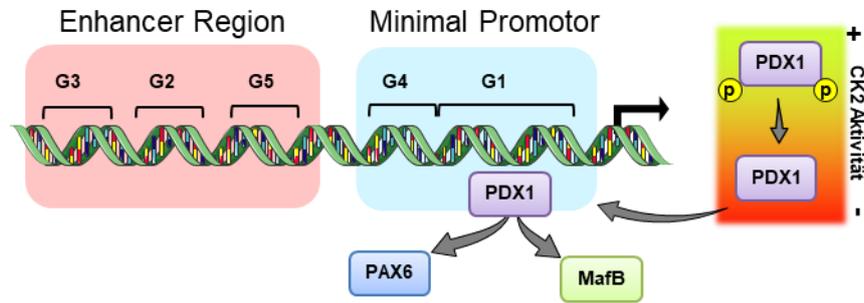


Abbildung 16: Protein-Expression von PDX1 in behandelten α TC1- und α TC1 KO-Zellen. (A) Repräsentative Western Blots. α TC1-Zellen wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Protein-Expression von PDX1 in zytoplasmatischen und nucleären Extrakten von behandelten α TC1- und α TC1 KO-Zellen. Als Ladekontrolle für die zytoplasmatischen Extrakte wurde GAPDH verwendet, während Nucleolin als Ladekontrolle für die nucleären Extrakte diente. **(B)** Quantitative Analyse der nucleären PDX1-Expression von (A). Die Expression von DMSO-behandelten-Zellen wurde auf 100% gesetzt (n=3). ***p < 0,001 gegen DMSO. MW \pm SD.

7.12 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Bindung von PDX1 an den GCG-Promotor

Ob die erhöhte PDX1-Expression zu einer Veränderung der Bindungspartner am GCG-Promoter führt, muss überprüft werden. Hierzu wird untersucht, ob PDX1 am GCG-Promoter bindet und wie es die aktivierenden Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Abb. 17A). Ritz-Laser et al. zeigten, dass eine ektopische Expression von PDX1 zu einer Bindung des Transkriptionsfaktors an das G1-Element des GCG-Promotors führt und somit die Bindung von PAX6 an den Promotor auflöst (Ritz-Laser et al., 2003). Um zu untersuchen, ob die reduzierte GCG-Expression in α TC1 CK2 α KO-Zellen ebenfalls in einer PDX1-vermittelten Regulation des Promotors gründet, wurde ein DNA-Pull-Down-Assay mit nucleären Extrakten von α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen durchgeführt. Im Folgenden wurden mittels Western Blot-Analyse die Bindung von PDX1 an den GCG-Promoter überprüft. Hierbei führte der Knockout von CK2 α in den α TC1 CK2 α KO-Zellen zu einer signifikant erhöhten Bindung von PDX1 an den GCG-Promotor (Abb. 17B). Folglich resultierte die erhöhte Protein-Expression von PDX1 im Zellkern in einer verstärkten Bindung an den GCG-Promotor. Zudem konnte bestätigt werden, dass diese erhöhte PDX1-Bindung vermutlich mit einer Verdrängung der aktivierenden Transkriptionsfaktoren einhergeht (Abb. 17).

A



B

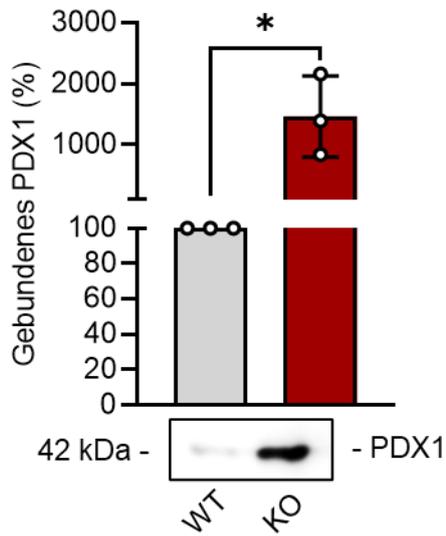


Abbildung 17: Pull-Down-Assay von PDX1 in α TC1(WT)- und α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen. (A) Schematische Darstellung der PDX1-vermittelten Verdrängung der aktivierenden Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB am G1-Element des GCG-Promotors nach Verlust der CK2-abhängigen Phosphorylierung an PDX1 (Quelle: Ampofo et al., 2024, modifiziert). **(B)** Repräsentativer Western Blot von PDX1(unten) der DNA-Pull-Down-Assays. Quantitative Analyse von PDX1 (oben) der Western Blots. Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). *p<0.05 gegen WT. MW \pm SD.

7.13 Einfluss einer Überexpression von PDX1 auf die GCG-Expression

Um die Bedeutung der CK2-spezifischen Phosphorylierung von PDX1 für die GCG-Expression zu erforschen, wurde die Phosphorylierung von PDX1 auf den spezifischen Stellen T231 und S232 durch die Überexpression sowohl von PDX1 Wildtyp (PDX1 WT) als auch einer PDX1 T231A/S232A Mutante (PDX1 Mut) in α TC1-Zellen untersucht. Die Auswirkungen auf die Pro-GCG-Expression wurden anschließend mittels Western Blot analysiert (Abb. 18).

Die Western Blot-Analyse ermöglichte es, den Einfluss der unterschiedlichen Phosphorylierungszustände von PDX1 auf die Expression von Pro-GCG zu quantifizieren und zu vergleichen. Durch diesen Vergleich kann beurteilt werden, ob die spezifische Phosphorylierung durch CK2 einen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der GCG-Expression hat.

Konsistent mit den vorherigen Experimenten führte eine PDX1-Mutante, die nicht mehr durch die CK2 phosphoryliert werden kann, zu einer reduzierten Pro-GCG-Expression in α TC1-Zellen (Abb. 18A und B). Die Wiederholung des Experiments mit α TC1 CK2 α KO-Zellen zeigte keine Veränderung der Pro-GCG-Expression (Abb. 18C und D). Durch dieses Experiment konnte bestätigt werden, dass die CK2-spezifische Phosphorylierung von PDX1 nicht nur die Bindung von PDX1 an den GCG-Promoter beeinflusst, sondern auch zu einer reduzierten GCG-Expression führt. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung von PDX1 durch die CK2 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der GCG-Expression spielt.

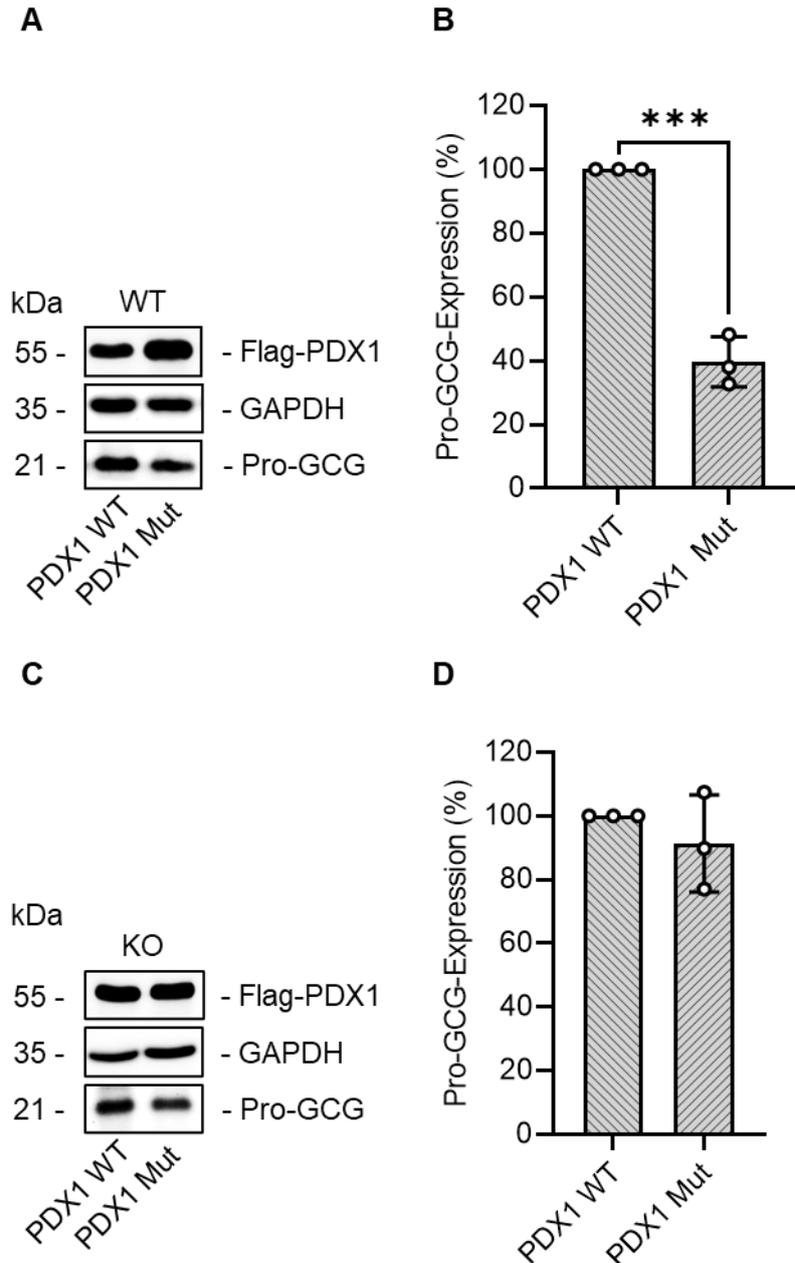


Abbildung 18: Protein-Expression von Pro-GCG in transfizierten α TC1- und α TC1 CK2 α KO-Zellen. (A) Repräsentative Western Blots von α TC1-Zellen, die mit einem PDX1 Wildtyp (PDX1 WT)- oder T231A/S232A-Konstrukt (PDX1 Mut) transfiziert wurden. Analysiert wurde die Protein-Expression von Pro-GCG. Als Ladekontrolle diente GAPDH, als Kontrolle der Transfektion diente Flag-PDX1. **(B)** Quantitative Analyse der Pro-GCG-Expression von (A). Die Expression von α TC1-Zellen, die mit PDX1 WT transfiziert wurden, wurde auf 100% gesetzt, nachdem sie auf GAPDH normiert wurden (n=3). ***p < 0.001 gegen PDX1 WT. MW \pm SD. **(C)** Repräsentative Western Blots von α TC1 CK2 α KO-Zellen, die mit einem PDX1 Wildtyp (PDX1 WT)- oder T231A/S232A- Konstrukt (PDX1 Mut) transfiziert wurden. Analysiert wurde die Protein-Expression von Pro-GCG. Als Ladekontrolle diente GAPDH, als Kontrolle der Transfektion diente Flag-PDX1. **(D)** Quantitative Analyse der Pro-GCG-Expression von (C). Die α TC1 CK2 α KO-Zellen, die mit PDX1 WT transfiziert wurden, wurden auf 100% gesetzt, nachdem sie auf GAPDH normiert wurden (n=3). MW \pm SD.

7.14 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die Insulin- und GCG-Sekretion *ex vivo*

Aufbauend auf den *in vitro* Experimenten, in denen eine verringerte Aktivität des GCG-Promotors aufgrund einer CK2-abhängigen Phosphorylierung des PDX1 nachgewiesen wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob diese Beobachtungen auch *ex vivo* reproduziert werden können. Hierfür wurden Langerhans-Inseln aus C57BL/6J-Mäusen isoliert und mit CX-4945 (10 μ M), SGC-CK2-1 (10 μ M) oder DMSO behandelt um die Gen-Expression und Sekretion von Insulin und GCG zu bestimmen (Abb. 19A). In Übereinstimmung mit den vorherigen *in vitro* Ergebnissen konnte ebenfalls eine deutlich verringerte mRNA-Expression von GCG nach CK2 Inhibition mittels ELISA gemessen werden (Abb. 19B) die mRNA-Expression und Sekretion von Insulin wurde hingegen signifikant erhöht (Abb. 19C und D).

Angesichts der Tatsache, dass vorangegangene Arbeiten zeigten, wie Insulin die GCG-Sekretion auf parakrine Weise beeinflusst (Bansal & Wang, 2008; Cooperberg & Cryer, 2010), wurden Inseln zusätzlich mit dem Insulinrezeptorblocker Linsitinib (Lin) behandelt und ebenfalls für den GCG-ELISA verwendet. Trotz der generell verringerten GCG-Sekretion in WT-Zellen nach der Behandlung mit Lin zeigten isolierte Langerhans-Inseln, die entweder einem der beiden Inhibitoren allein oder in Kombination mit dem Insulinrezeptorblocker ausgesetzt waren, eindeutig, dass die Hauptursache für die Reduktion der GCG-Sekretion die Hemmung von CK2 ist (Abb. 19E)

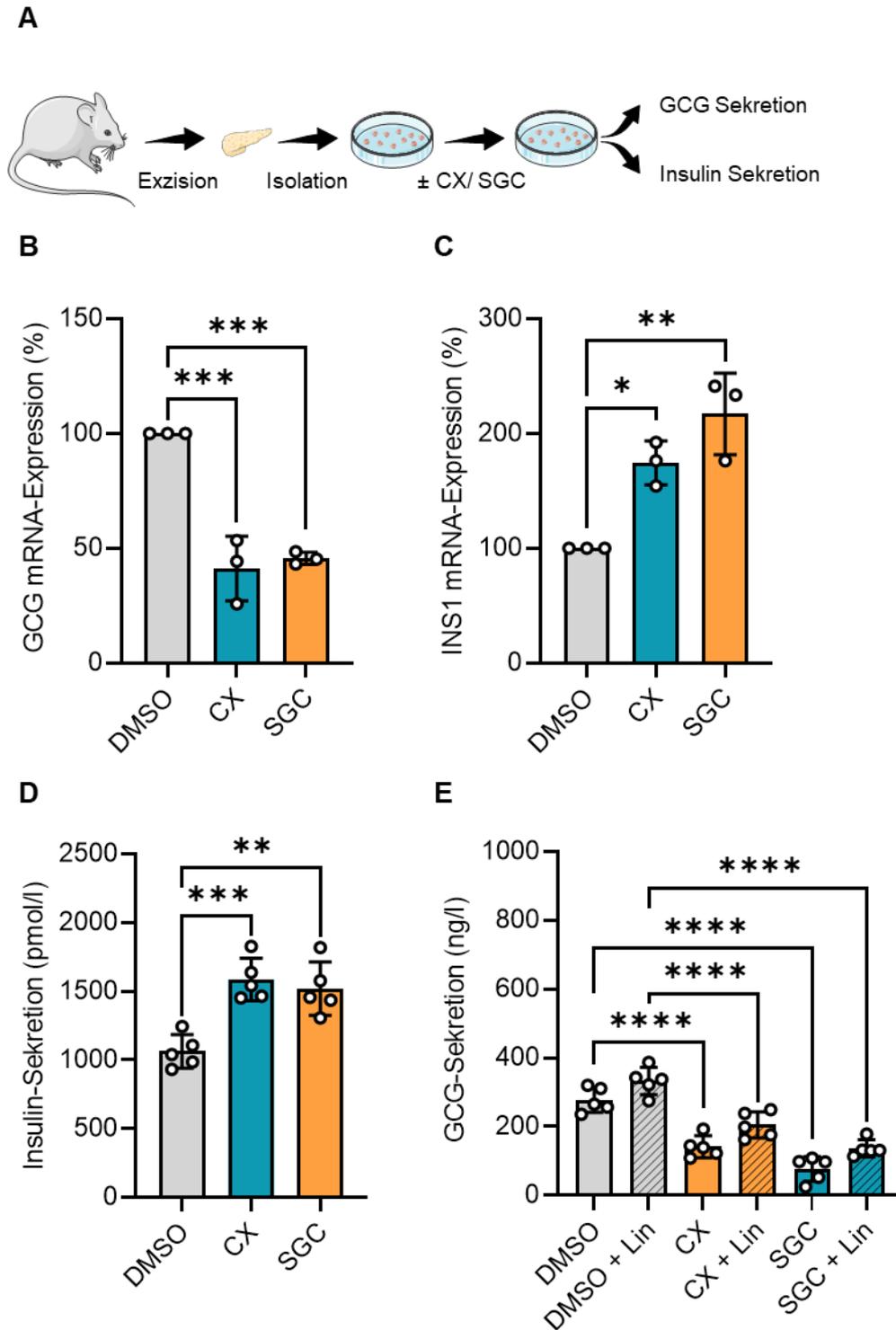


Abbildung 19: mRNA-Expression und Sekretion von Insulin und GCG von behandelten isolierten Langerhans-Inseln. (A) Schematische Darstellung der Isolierung und Behandlung von Langerhans-Inseln von C57BL/J Mäusen. Murine Langerhans-Inseln wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die GCG- (B) und INS1- Expression (C) in behandelten murinen Langerhans-Inseln. Die DMSO-behandelten Langerhans-Inseln wurden auf 100% gesetzt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 gegen DMSO. MW \pm SD. (D) Langerhans-Inseln wurden mit CX-4945 (CX,

10 μM) und SGC-CK2-1 (SGC, 10 μM) für 24 h behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Analysiert wurde die Insulin-Sekretion in behandelten murinen Langerhans-Inseln. Die Daten sind absolute Werte und in (pmol/l) dargestellt. (n=5). **p< 0,01, ***p< 0,001 gegen DMSO. MW \pm SEM. (E) Langerhans-Inseln wurden mit CX-4945 (CX), CX-4945 + Lin (CX + Lin), SGC-CK2-1 (SGC), und SGC-CK2-1 + Lin (SGC + Lin) behandelt. Als Kontrolle diente eine Behandlung mit DMSO, und DMSO + Lin. Analysiert wurde die GCG-Sekretion in behandelten murinen Langerhans-Inseln. Die Daten sind absolute Werte und in (ng/l) dargestellt. (n=5). ****p< 0,0001 gegen DMSO. MW \pm SEM. (Quelle: Ampofo et al., 2024, modifiziert)

7.15 Einfluss eines CK2 α Knockouts auf die GCG-Sekretion von Pseudoinseln (PI)

Da ein Knockout der Alpha-Zellen in murinen Pankreasinseln nur durch aufwändige Verfahren realisierbar ist, wurden stattdessen Pseudoinseln (PI) aus MIN6- und αTC1 -Zellen (PI WT) bzw. MIN6- und αTC1 CK2 α KO-Zellen (PI KO) erzeugt (Abb. 20A). Dieses artifizielle Modell erlaubt parakrine Einflüsse, die vergleichbar mit denen nativer Inseln sind.

Die Pseudoinseln wurden für immunhistochemische Färbungen geerntet und eingebettet. Eine manuelle Analyse der zellulären Zusammensetzung (Abb. 20B) mittels ImageJ und ein Vergleich zwischen PI WT und PI KO zeigten, dass der Knockout von CK2 in den αTC1 CK2 α KO-Zellen keinen Einfluss auf die Zellzusammensetzung hatte (Abb. 20C).

In einem weiteren Experiment wurden PI WT und PI KO generiert. Sowohl unbehandelte als auch mit Linsitinib behandelte PI WT und PI KO wurden auf ihre GCG-Sekretion hin mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die Erwartungen und die Resultate der vorherigen Experimente: Die GCG-Sekretion war bei PI KO signifikant geringer als bei PI WT, auch nach zusätzlicher Behandlung mit Linsitinib (Abb. 20D).

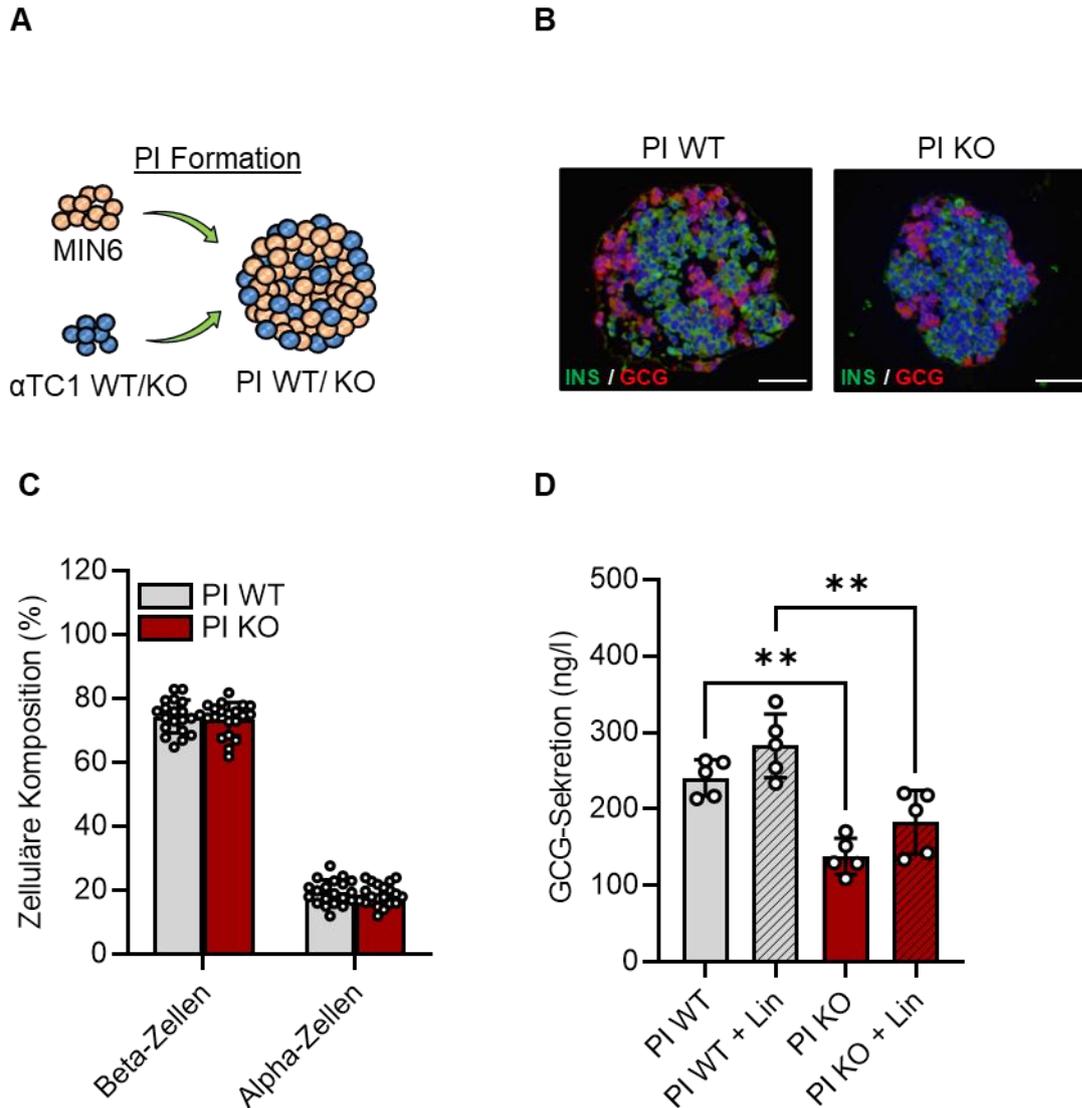


Abbildung 20: Zelluläre Zusammensetzung von Pseudoinseln (PI) und GCG-Sekretion. (A) Schematische Darstellung der Generierung von PI aus MIN6- und α TC1-Zellen (PI WT) oder MIN6- und α TC1 CK2 α KO-Zellen (PI KO). (B) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von Insulin (Ins, Grün) /GCG (GCG, Rot) von PI WT oder PI KO. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 75 μ m. (C) Quantitative Analyse von Insulin- (Beta-Zellen) und GCG- (Alpha-Zellen) Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n=20). MW \pm SEM. (D) Quantitative Analyse der GCG-Sekretion von unbehandelten PI WT oder PI KO, sowie PI, welche zusätzlich noch mit Lin behandelt wurden (PI WT+Lin, PI KO+Lin) (n=5). ** p < 0.01, MW \pm SD (Quelle: Ampofo et al., 2024, modifiziert).

7.16 Transplantation von α TC1- oder α TC1 KO-Zellen unter die Nierenkapsel

Basierend auf den *in vitro* und *ex vivo* Experimenten wurde anschließend untersucht, ob die Transplantation von α TC1-Zellen unter die Nierenkapsel von Mäusen einen Einfluss auf die Wiederherstellung des physiologischen Blutglukosespiegels nach dem Fasten, im Vergleich zur Transplantation von α TC1 CK2 α KO-Zellen, ausüben kann. Diese Experimente wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob die CK2-vermittelte Regulation der GCG-Expression, die zuvor in α TC1-Zellen und PI beobachtet wurde, auch *in vivo* Auswirkungen auf die Blutzuckerhomöostase hat. Ziel war es, zu verstehen, ob der Knockout von CK2 in Alpha-Zellen den Glucagon-basierten Regulationsmechanismus beeinflussen und damit zur Normalisierung des Blutglukosespiegels beitragen könnte. Hierbei wurde das bereits etablierte Nierenkapsel-Modell verwendet (Wrublewsky et al., 2022). Am Tag 0 wurden den Empfängertieren mit einem normoglykämischen Blutglukosespiegel entweder α TC1- oder α TC1 CK2 α KO-Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert. Die Blutglukosespiegel sowie das Körpergewicht der Tiere wurden anschließend zweimal wöchentlich gemessen. Als weitere Kontrollgruppe diente eine sham-transplantierte Gruppe von Mäusen. Am Tag 28 wurde ein intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (IPGTT) durchgeführt. Zudem wurde den Empfängertieren nach dem IPGTT, Blut entnommen, um Plasma herstellen zu können (Abb. 21).

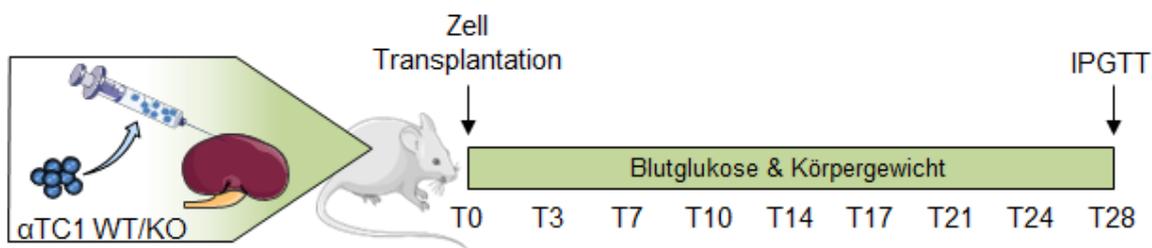


Abbildung 21: Schematische Darstellung des *in vivo* Versuchsaufbaus zur Analyse der Transplantation von α TC1(WT)- oder α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen unter die Nierenkapsel. Am Tag 0 wurden α TC1- oder α TC1 CK2 α KO-Zellen unter die linke Nierenkapsel von C57Bl6/J Mäusen transplantiert. Sham-transplantierte Tiere dienten als Negativkontrolle. Der Nüchternblutglukosespiegel und das Körpergewicht wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen zweimal pro Woche gemessen. Am 28. Tag wurde ein intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (IPGTT) durchgeführt. (Quelle: Ampofo et al., 2024, modifiziert)

Ergebnisse

Das Körpergewicht der Tiere, die entweder α TC1- oder α TC1 CK2 α KO-Zellen transplantiert bekamen, zeigten während des 28-tägigen Beobachtungszeitraums keine Unterschiede (Abb. 22A und B). Im Gegensatz dazu wurden während der gesamten Studiendauer signifikant höhere Blutzuckerwerte nach dem Fasten bei Mäusen gemessen, die mit α TC1-Zellen transplantiert wurden, im Vergleich zu den Mäusen mit Sham-Transplantaten oder α TC1 CK2 α KO-Zellen (Abb. 22C und D).

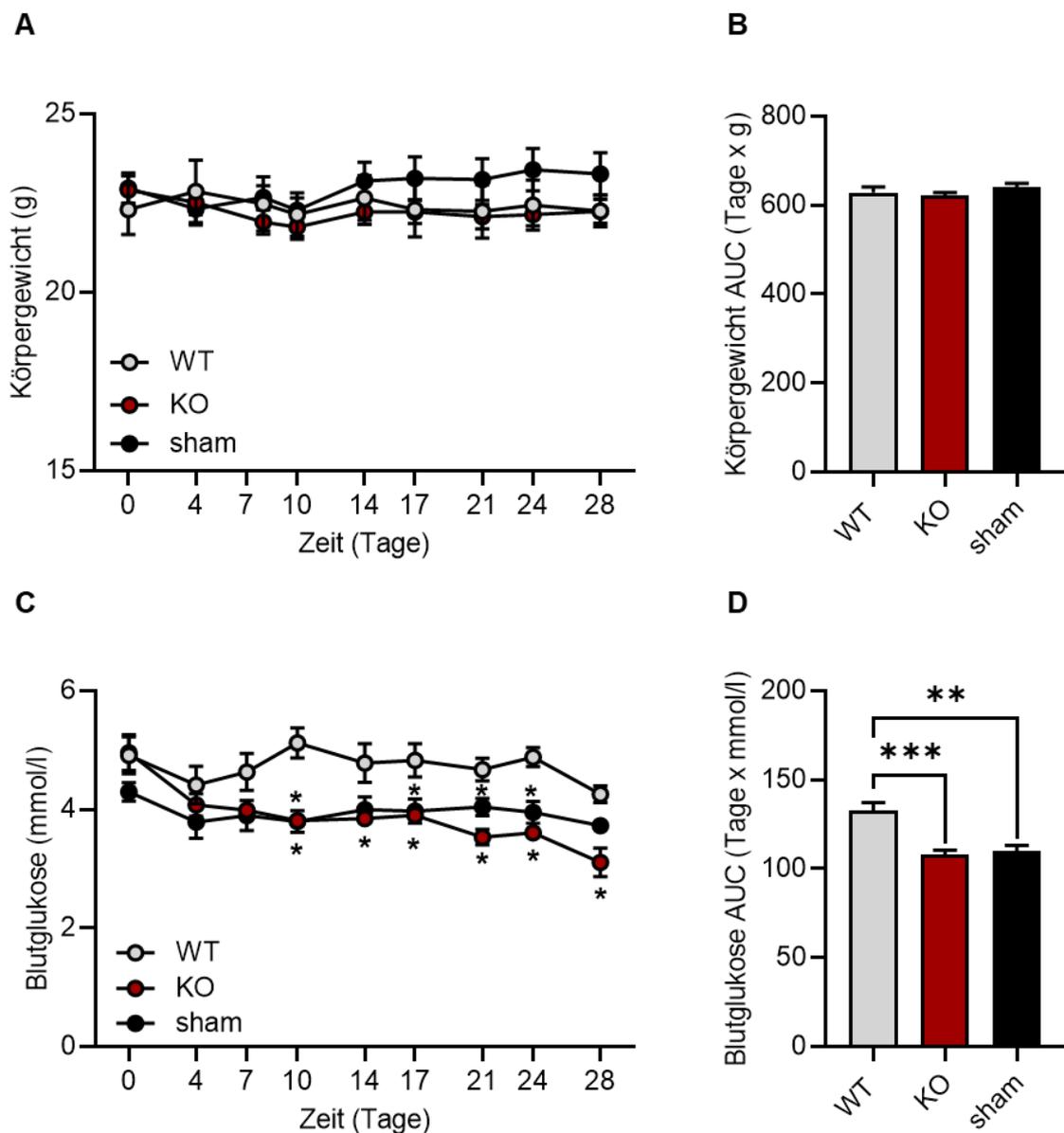


Abbildung 22: Bestimmung der Körpergewichte und Messung der Blutglukosespiegel der Empfängertiere.

Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (A) und entsprechende AUC (B, Tage x g) von Mäusen, welchen entweder α TC1(WT)- oder α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert wurden (Tag 0 bis Tag 28). Sham-transplantierte Tiere dienten als Negativkontrolle (n=5) MW \pm SEM. (C) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mmol/l) von Mäusen, welchen entweder α TC1(WT)- oder α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert wurden (Tag 0 bis Tag 28). Sham-transplantierte Tiere dienten als Negativkontrolle (n=5). MW \pm SEM. (D) AUC (Tage x mmol/l) der Blutglukosespiegel von (C) (n = 6; sham: n = 5). **p<0,01, ***p<0,001 gegen WT. MW \pm SEM.

Basierend auf der festgestellten Hyperglykämie bei den Tieren, denen WT-Zellen unter die Nierenkapsel transplantiert wurden, wurde daraufhin die Auswirkung der CK2-vermittelten veränderten GCG-Expression auf die Glukosetoleranz und -clearance untersucht. Der hierfür durchgeführte IPGTT an Tag 28 nach der Transplantation zeigte signifikant höhere Blutglukosespiegel bei Mäusen, die WT-Zellen erhielten (Abb. 23A und B).

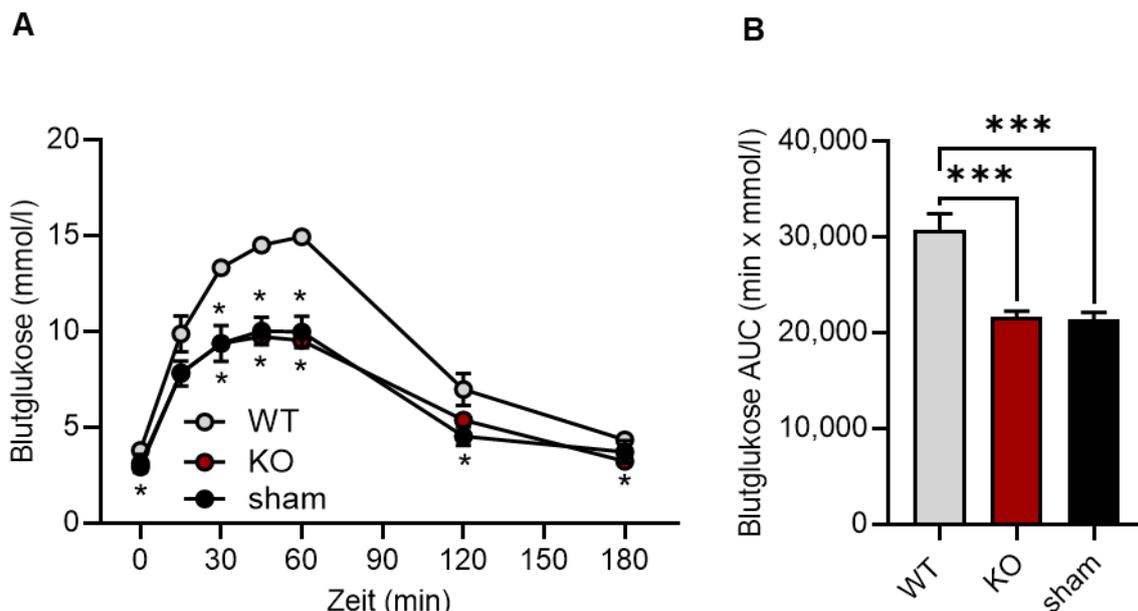


Abbildung 23: IPGTT der Empfängertiere im Mausmodell. Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mmol/l) während des IPGTT an Tag 28 (A) und entsprechende AUC (B, min x mmol/l) von Mäusen, denen entweder α TC1(WT)- oder α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen transplantiert wurden. Sham-transplantierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (n=6, sham: n=5). ***p<0,001 gegen WT. MW \pm SEM.

Es ist nicht überraschend, dass diese Tiere eine erhöhte Glukoneogenese aufweisen und somit eine Hyperglykämie entwickeln, da sie zusätzliche Alpha-Zellen besitzen, die nicht unter der parakrinen Kontrolle der Inselzellen des Pankreas stehen. Tatsächlich konnte ein erhöhter GCG-Serumspiegel und niedrigere Insulinspiegel bei Mäusen der α TC1-Gruppe im Vergleich zu Mäusen der α TC1 CK2 α KO- und shamtransplantierten-Gruppe beobachtet werden (Abb. 24A und B).

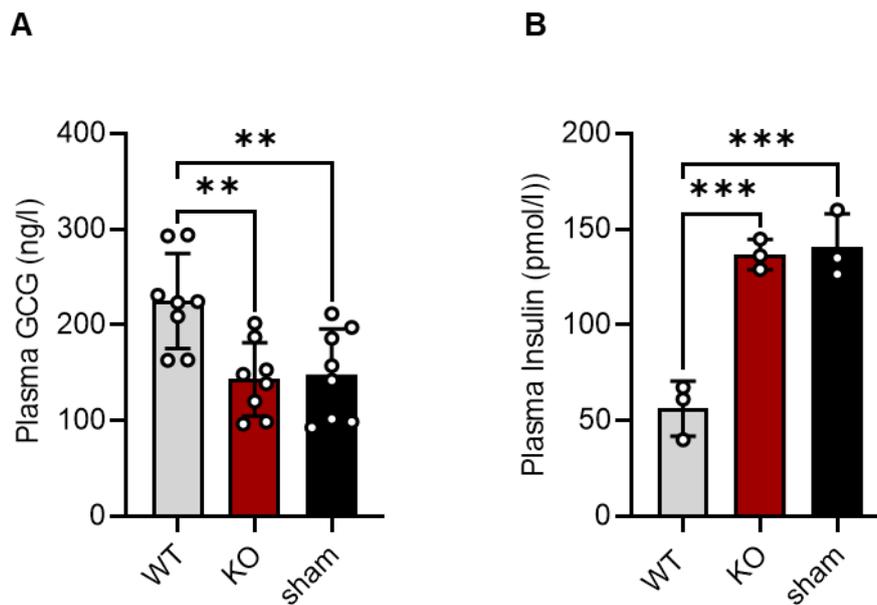


Abbildung 24: GCG- und Insulin- Konzentration im Plasma von Empfängertieren im Mausmodell. Quantitative Analyse der GCG- (A, ng/l) und Insulin-Sekretion (B, pmol/l) von Mäusen, denen entweder α TC1(WT)- oder α TC1 CK2 α KO(KO)-Zellen transplantiert wurden. Sham-transplantierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (n=6, sham: n=5). **p<0,01, ***p< 0,001 gegen WT. MW \pm SEM.

7.17 Einfluss einer CK2 Inhibition auf die GCG- und Insulin-Sekretion von humanen Langerhans-Inseln

Um die Relevanz dieser Erkenntnisse auf den Menschen zu überprüfen, ist es wichtig, die Unterschiede zwischen dem Aufbau der Langerhans-Inseln von Mäusen und Menschen zu berücksichtigen. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer zellulären Zusammensetzung, sondern auch in den Interaktionen zwischen den Inselzellen (Unger & Orci, 2010). Solche Unterschiede könnten dazu führen, dass die Effekte einer

CK2 Inhibition auf die GCG-Expression bei Mäusen nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die GCG-Expression nicht spezifisch für Mäuse sind, wurde die GCG-Sekretion in Langerhans-Inseln von gesunden humanen Spendern untersucht. Diese Experimente wurden vom Transplantationsinstitut in Alberta, Kanada, durchgeführt und die Ergebnisse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden isolierte humane Inseln für 24 h mit CX-4945 (10 μ M), SGC-CK2-1 (10 μ M) oder DMSO behandelt. Anschließend wurde die GCG-Sekretion durch einen Puffer mit niedriger Glukose (3 mmol/l Glukose) induziert, der mit glukoseabhängigem insulinotropem Polypeptid (GIP) und Alanin ergänzt wurde (Abb. 25). In Übereinstimmung mit den bereits erbrachten Ergebnissen sowohl aus den α TC1-Zelllinien, als auch den murinen Inseln reduzierte die CK2-Hemmung die GCG-Sekretion aus menschlichen Inseln erheblich (Abb. 25B). Dementsprechend verzeichnete die AUC von CX-4945- und SGC-CK2-1-exponierten menschlichen Inseln im Vergleich zu Kontroll-Inseln eine signifikante Reduktion (Abb. 25C). Zusätzlich wurde die Insulinfreisetzung der humanen Langerhans-Inseln analysiert. Wie erwartet führte eine Glukosekonzentration von 3 mmol/l in allen Gruppen nur zur Freisetzung geringer Mengen an Insulin (Abb. 25D). Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die CK2 in der Lage ist, die GCG-Genexpression in humanen Alpha-Zellen zu unterdrücken was eine verringerte GCG-Sekretion zur Folge hat.

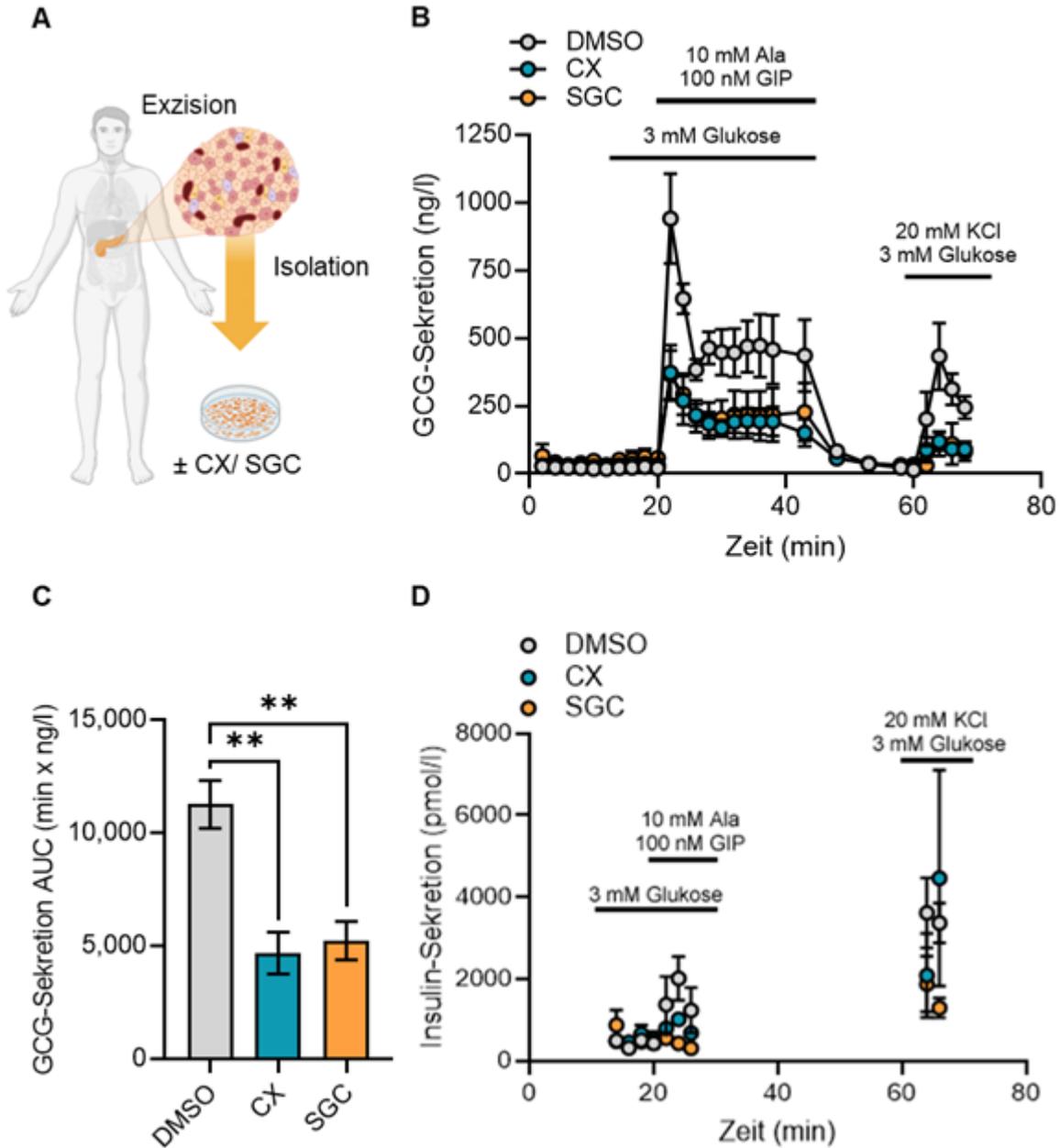


Abbildung 25: GCG- und Insulin-Sekretion in humanen Inseln. (A) Schematische Darstellung zur Isolierung humaner Langerhans-Inseln, deren Exposition gegenüber Inhibitoren und Analyse der endokrinen Funktion. (B) Isolierte humane Langerhans-Inseln (Spender: n=3) wurden für 24 h mit CX-4945 (CX, 10 μ M) oder SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Die GCG-Sekretion (ng/l) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten sowie bei Änderungen von Glukose und KCl gemessen. MW \pm SEM. (C) AUC (min x ng/l) der Blutglukosespiegel von (B). **p<0,01 gegen DMSO. MW \pm SEM. (D) Humane isolierte Langerhans-Inseln (Spender: n=3) wurden mit CX-4945 (CX, 10 μ M) oder SGC-CK2-1 (SGC, 10 μ M) behandelt. Als Kontrolle diente DMSO. Die Insulin-Sekretion (pmol/l) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten sowie bei Änderungen von Glukose und KCl gemessen. MW \pm SEM.

(Quelle: Erstellt mit BioRender)

7.18 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die Proliferation und Viabilität

Beide Untereinheiten (α/α') der CK2 weisen eine ähnliche Primärstruktur und Konformation auf und sind ebenfalls katalytisch aktiv. Zudem binden sie beide an die regulatorische Untereinheit CK2 β , um das Holoenzym zu bilden (Bischoff et al., 2011; Raaf et al., 2013). Trotz ihrer funktionellen Redundanz gibt es Hinweise darauf, dass CK2 α und CK2 α' unterschiedliche, spezifische Rollen in bestimmten Signalwegen und physiologischen Prozessen haben können (St-Denis & Litchfield, 2009). Diese Beobachtungen legen nahe, dass CK2 α und CK2 α' nicht einfach austauschbare Isoformen sind, sondern möglicherweise einzigartige Rollen auch in der Regulation des GCG-Promotors spielen können. Für diese Untersuchungen wurde mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode analog zur Herstellung der α TC1 CK2 α KO-Zellen, eine Zelllinie generiert, bei der die katalytische CK2 α' -Untereinheit ausgeschaltet wurde.

In den vergangenen Experimenten konnte mit Hilfe der α TC1 CK2 α KO-Zellen gezeigt werden, dass die verringerte Aktivität des GCG-Promotors in WT-Zellen auf einer CK2-abhängigen Phosphorylierung des PDX1 beruht. In den folgenden Experimenten wurde nun untersucht, wie sich ein Knockout der zweiten katalytischen Untereinheit (α') auf die GCG-Expression und Regulation des GCG-Promotors auswirkt.

Im ersten Abschnitt dieser Versuchsreihe wurden die ersten Experimente ab Abschnitt 7.5 bis 7.12 mit der neuen Zelllinie wiederholt und die Proliferation und Zellviabilität der beiden miteinander verglichen. Hierfür wurde ein WST- und LDH-Assay durchgeführt. Es wurden keine Veränderungen in der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen festgestellt, und auch der Knockout von CK2 α' führte zu keiner veränderten LDH-Freisetzung (Abb. 26A und B).

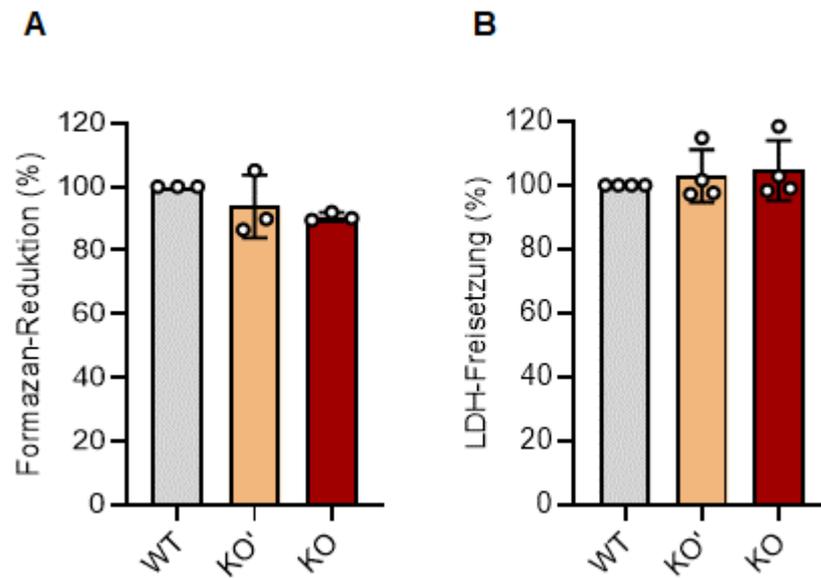


Abbildung 26: WST- und LDH-Assay von α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α' KO(KO')-Zellen. Analysiert wurde die Formazan-Reduktion (A) und die LDH-Freisetzung (B) in α TC1-, α TC1 CK2 α KO- und α TC1 CK2 α' KO-Zellen. Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (A: n=3, B: n=4). MW \pm SD.

In Ergänzung zu diesen Assays wurden auch Wachstumskurven von α TC1-, α TC1 CK2 α KO- und α TC1 CK2 α' KO-Zellen erstellt, und die Zellviabilität wurde ermittelt. Der Verlust sowohl von CK2 α , als auch CK2 α' führte zu einer ähnlichen Reduktion der Proliferation und Viabilität der Zellen (Abb. 27A und B).

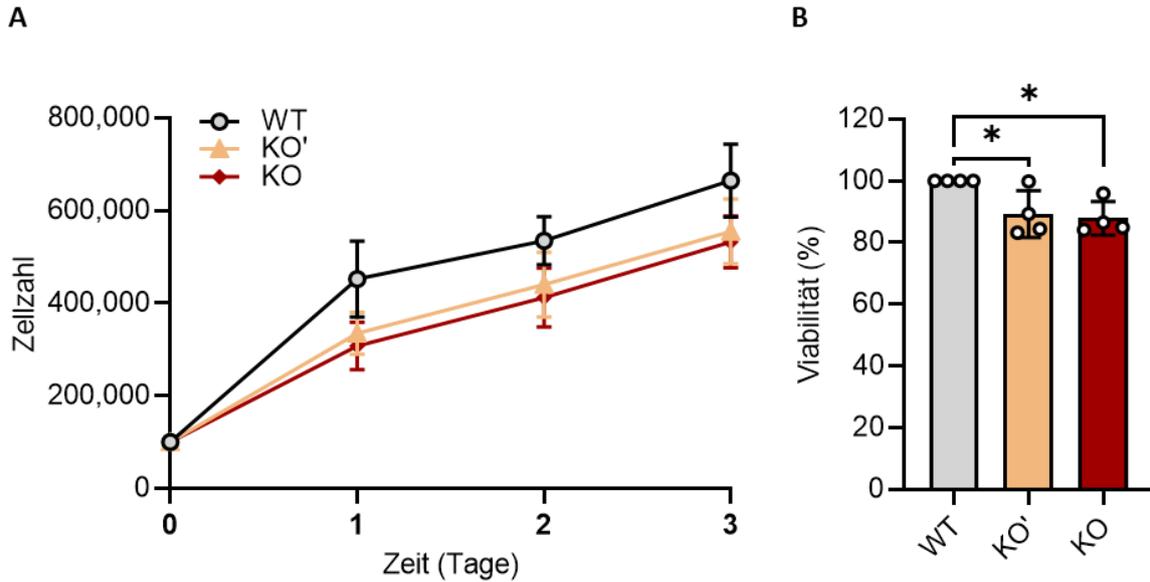


Abbildung 27: Wachstumskurve und Viabilität von α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α' KO(KO')-Zellen. Analysiert wurde die Zellzahl (A) nach 24 h, 48 h und 72 h, sowie die Viabilität (B) nach 72 h. (A: n=4; B: n=4) Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=4). *p< 0,05 gegen WT. MW \pm SD.

7.19 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die CK2 Protein- und mRNA-Expression

Bisher zeigte sich, dass der Knockout von CK2 α' ähnliche Auswirkungen auf die Zellproliferation und Viabilität von α TC1-Zellen hatte, wie der Knockout von CK2 α . Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss des Knockouts auf die Aktivität der CK2 untersucht. Für diesen Zweck wurden Western Blots durchgeführt, um die Expression von pAkt, Akt, CK2 α , CK2 α' , GAPDH und CK2 β zu untersuchen (Abb. 28). Die Ergebnisse zeigen, dass der Knockout der CK2-Untereinheiten lediglich die Expression der jeweiligen ausgeschalteten Untereinheit beeinflusst, während die Expression der jeweils anderen katalytisch aktiven Untereinheit weiterhin nachgewiesen werden kann (Abb. 28B und C). Des Weiteren wirkt sich der Knockout von CK2 α' nicht negativ auf die Phosphorylierung von Akt an Serin129 aus (Abb. 28D). Die Expression der CK2 β -Untereinheit wird bei einem Knockout von CK2 α' etwa um 40% reduziert im Gegensatz zum Knockout von CK2 α , welche eine stärkere Reduktion um etwa 60% verzeichnet (Abb. 28E). Interessanterweise hatte der Knockout von CK2 α' in α TC1-Zellen eine vergleichbare Auswirkung auf die CK2-Aktivität wie der Knockout von CK2 α (Abb. 28F).

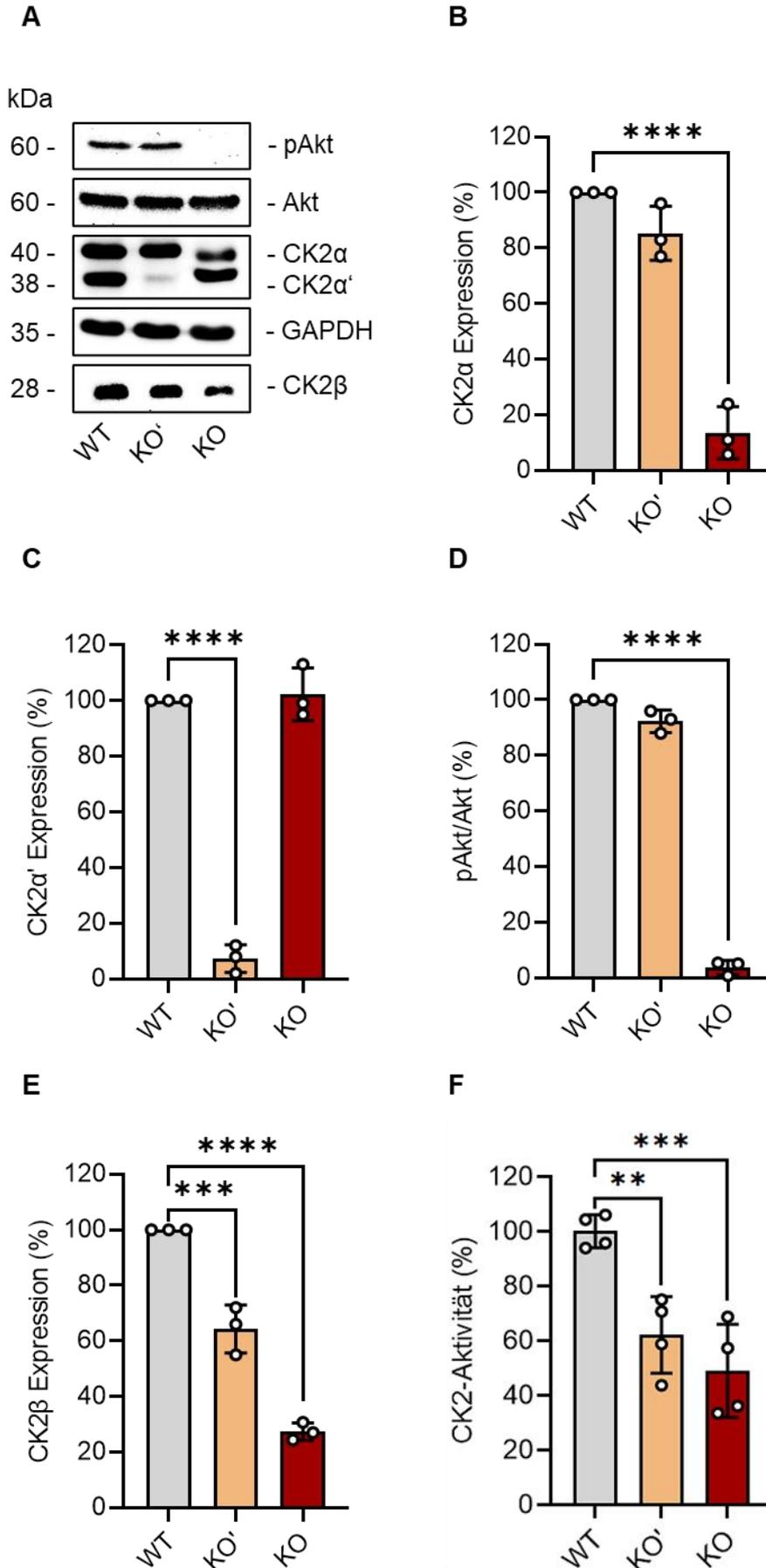


Abbildung 28: Protein-Expression von pAkt, Akt, CK2 α , CK2 α' und Pro-GCG in α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α' KO(KO')-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot. Analysiert wurde die Protein-Expression von pAkt, Akt, CK2 α , CK2 α' , CK2 β , und Pro-GCG. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Quantitative Auswertung der Western Blots von (A). Analysiert wurde die Protein-Expression von CK2 α (B), CK2 α' (C), pAkt/Akt (D) und CK2 β (E). Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). (F) α TC1-, α TC1 CK2 α KO- und α TC1 CK2 α' KO-Zellextrakte wurden mit [³²P γ]ATP und dem synthetischen CK2-Substratpeptid RRRDDDSDDD inkubiert (Das Experiment wurde von C. Götz durchgeführt). Nach der Kinasereaktion wurde das in das Peptid eingebaute markierte Phosphat mittels Čerenkov-Zählung gemessen. Die Aktivität, die in den Kontrolleextrakten (WT) gemessen wurde, wurde als 100% gesetzt, und die Aktivität der behandelten Extrakte wurde relativ dazu berechnet (n=3). **p< 0,01, ***p< 0,001, ****p<0,0001 gegen WT. MW \pm SD.

7.20 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die GCG-Expression und -Sekretion

Da der CK2 α' -Knockout keine signifikanten Auswirkungen auf die CK2 α -Untereinheit zeigt und die Phosphorylierungsstelle S129 in Akt unverändert bleibt, jedoch die Gesamtaktivität des CK2-Enzyms ähnlich wie beim CK2 α -Knockout herunterreguliert wird, wurde untersucht, ob diese Aktivitätsreduktion ebenfalls zu einer verminderten Pro-GCG-Expression führt. Zu diesem Zweck wurden die Pro-GCG-Gen- und Protein-Expression (Abb. 29B und C) sowie die GCG-Sekretion (Abb. 29D) mittels Western Blot, qRT-PCR-Analysen und ELISA-Assay in α TC1-, α TC1 CK2 α KO- und α TC1 CK2 α' KO-Zellen analysiert. Im Gegensatz zum CK2 α -Knockout zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg sowohl der Gen- und Protein-Expression als auch der sezernierten GCG-Menge.

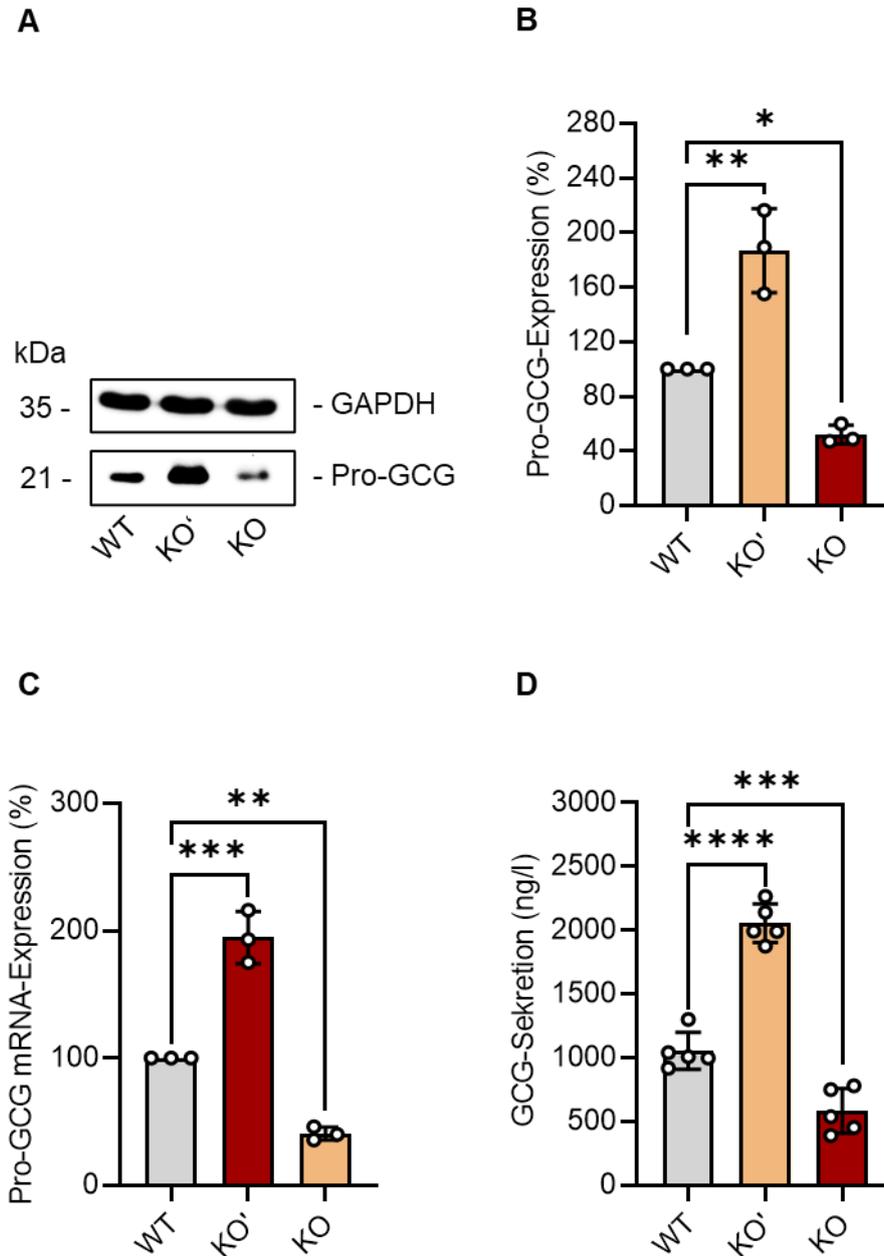
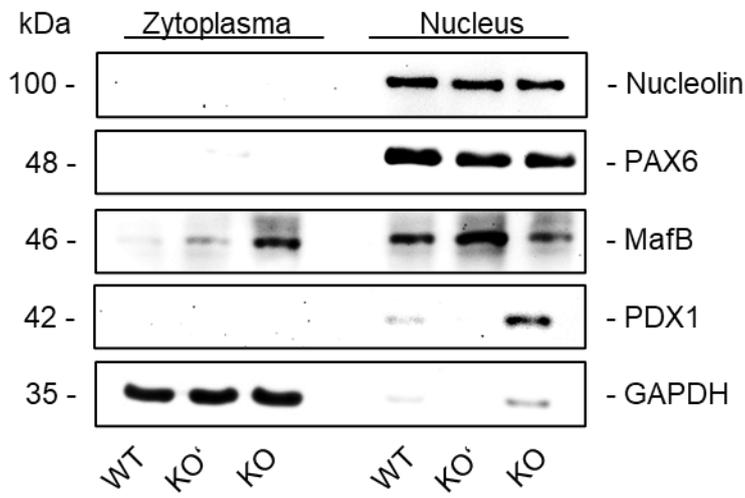


Abbildung 29: mRNA-Expression und Sekretion von GCG in α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α' KO(KO')-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot. Analysiert wurde die Protein-Expression von Pro-GCG. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Quantitative Auswertung der Western Blots von (A). Analysiert wurde die Protein-Expression von Pro-GCG (B). Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01 gegen WT. MW \pm SD. (C) Analysiert wurde die mRNA-Expression von GCG mRNA-Expression. Nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH, wurden die WT-Zellen auf 100% gesetzt. (n = 3). **p < 0,01, *p < 0,001 gegen WT. MW \pm SD. (D) Analysiert wurde die GCG-Sekretion. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in ng/l dargestellt (n = 5). ***p < 0,001, ****p < 0,0001 gegen WT. MW \pm SEM.**

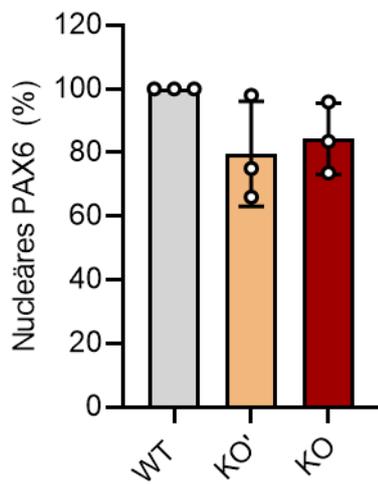
7.21 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die nucleäre Expression von PDX1, PAX6 und MafB

Aufgrund der Tatsache, dass ein Knockout von CK2 α' nicht nur die Sekretion, sondern auch die mRNA-Expression von GCG beeinflusst, liegt die Vermutung nahe, dass ein Knockout von CK2 α' ebenfalls die Regulation des GCG-Promotors beeinflusst. Zur Untersuchung des genauen Mechanismus, wurden zytoplasmatische und nucleäre Proteinextrakte von α TC1-Zellen und den beiden α TC1 CK2 KO-Zelllinien generiert, um die subzelluläre Lokalisation der Transkriptionsfaktoren PAX6, MafB und PDX1 mit Hilfe von Western Blot-Analysen detektieren zu können (Abb. 30A). Es wurde keine veränderte Expression des aktivierenden Transkriptionsfaktors PAX6 in den α TC1 CK2 α' KO-Zellen festgestellt (Abb. 30B). Jedoch wurde eine Veränderung in der Expression von MafB beobachtet, der ebenfalls als aktivierender Transkriptionsfaktor wirkt (Abb. 30C). Interessanterweise wurde in diesen α TC1 CK2 α' KO-Zellen eine zusätzliche Reduktion des PDX1 beobachtet (Abb. 30D).

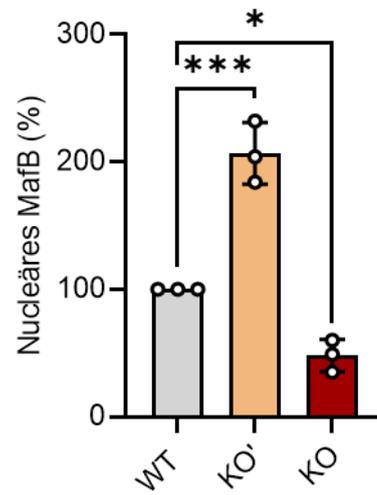
A



B



C



D

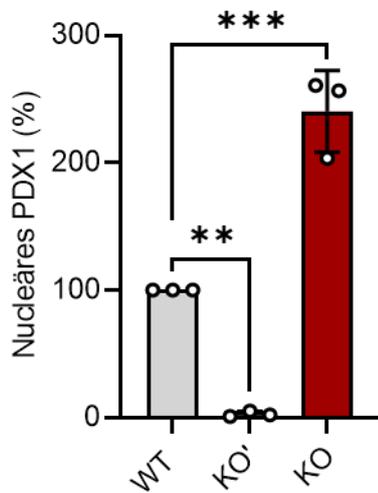


Abbildung 30: Protein-Expression von PAX6, MafB und PDX1 in α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α ' KO(KO')-Zellen. (A) Zytoplasmatische und nucleäre Proteinextrakte wurden generiert. Analysiert wurde die Protein-Expression von PAX6, MafB und PDX1. Als Ladekontrolle für die zytoplasmatischen Extrakte wurde GAPDH verwendet, während Nucleolin als Ladekontrolle für die nucleären Extrakte diente. Quantitative Analyse der nucleären PAX6- (B), MafB- (C) und PDX1-Expression (D), von (A). Die Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in WT-Zellen wurde auf 100% gesetzt (n=3). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001 gegen WT. MW \pm SD.

7.22 Einfluss eines Knockouts von CK2 α ' auf die Bindung von PAX6 und MafB an den GCG-Promotor

Die veränderte Expression der Transkriptionsfaktoren MafB und PDX1 nach dem Knockout von CK2 α ' könnte die gesteigerte Expression und Sekretion von GCG erklären. Um sicherzustellen, dass diese Transkriptionsfaktoren tatsächlich am GCG-Promotor binden, ist ein Pull-Down-Assay erforderlich (Abb. 31A). Nach Generierung von nucleären Extrakten von α TC1-, sowie den α TC1 CK2 KO-Zelllinien wurde die Bindung der Transkriptionsfaktoren am GCG-Promotor mittels Western Blot untersucht. Dieser Assay zeigte, dass trotz unveränderter Protein-Expression von PAX6 eine erhöhte Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor stattfindet (Abb. 31B). Die gesteigerte Protein-Expression von MafB spiegelt sich ebenfalls in einer verstärkten Bindung an den Promotor wider (Abb. 31C). Es konnte keine PDX1-Bindung in α TC1 CK2 α ' KO-Zellen beobachtet werden.

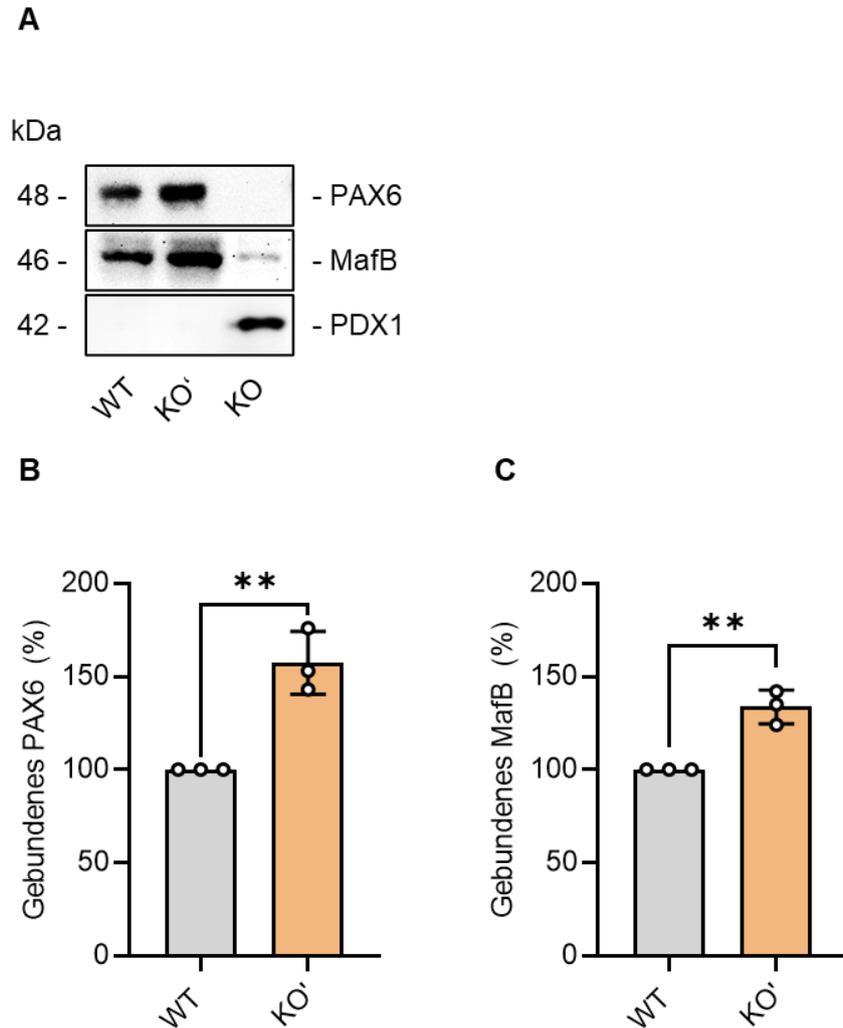


Abbildung 31: Pull-Down-Assay von PAX6 und MafB in α TC1(WT)-, α TC1 CK2 α KO(KO)- und α TC1 CK2 α ' KO(KO')-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot der DNA-Pull-Down-Assays von PAX6, MafB und PDX1. Quantitative Analyse von PAX6 (B) und MafB (C) der Western Blots. Die WT-Zellen wurden auf 100% gesetzt (n=3). **p< 0.01 gegen WT. MW \pm SD.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Knockout von CK2 α ' ähnliche Auswirkungen auf die Zellproliferation und Viabilität von α TC1-Zellen hatte, wie der Knockout von CK2 α . Interessanterweise führte der CK2 α '-Knockout zu einer Steigerung der GCG-Expression und -Sekretion im Gegensatz zum Knockout von CK2 α . Die Analyse der Transkriptionsfaktoren ergab, dass trotz gleichbleibender PAX6-Expression gab, dieser Transkriptionsfaktor eine verstärkte Bindung an den GCG-Promotor aufwies. Die erhöhte Expression und Bindung des Transkriptionsfaktors MafB konnte ebenfalls beobachtet werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Knockout von CK2 α '

einen völlig gegensätzlichen Mechanismus aktiviert im Vergleich zu dem, der nach einem Knockout von CK2 α auftritt.

8. Diskussion

8.1 Überprüfung des neu entwickelten CK2-Inhibitors SGC-CK2-1

Die Entdeckung, dass die CK2-Expression und CK2-Proteinkinase-Aktivität in schnell proliferierenden Zellen erhöht ist, hat die Entwicklung von Kinaseinhibitoren vorangetrieben, um diese als potenzielle Antineoplastika einzusetzen (Borgo & Ruzzene, 2019; Song et al., 2015; Zanin et al., 2012). Die Weiterentwicklung von CK2 Inhibitoren wurde durch strukturbasiertes Design und Screening-Methoden vorangetrieben, um die Spezifität und Selektivität zu erhöhen (Borgo & Ruzzene, 2021). Dennoch weisen etablierte ATP-kompetitive CK2 Inhibitoren, wie Silmitasertib (CX-4945), nach wie vor Off-Target-Effekte auf (Borgo et al., 2021; Grygier et al., 2023; H. Kim et al., 2014; Pierre et al., 2011). Diese bekannten Off-Target-Effekte der Inhibitoren wurden in Kauf genommen, da das primäre Ziel weiterhin die Hemmung des Tumorwachstums und die Einleitung der Apoptose in den Tumorzellen ist. Daher ist es nachvollziehbar, dass CX-4945 als spezifischer CK2 Inhibitor in die klinische Phase II übergegangen ist (ClinicalTrials.gov, NCT02128282). Aufgrund ihrer zahlreichen Substrate ist der Einfluss der Proteinkinase CK2 auf den Stoffwechsel äußerst vielseitig. Studien haben gezeigt, dass diese Kinase auch eine bedeutende Rolle in der Regulation der Glukosehomöostase spielt (Al Quobaili & Montenarh, 2012; Borgo et al., 2017; Montenarh, 2014; Pack et al., 2022; St-Denis & Litchfield, 2009; Welker et al., 2013; Wilhelm et al., 2012). Auch in diesem Fall erschweren Off-Target-Effekte die Untersuchung der grundlegenden Mechanismen einer CK2 Inhibition. Kürzlich wurde ein neuer CK2 Inhibitor namens SGC-CK2-1 veröffentlicht, der keine antiproliferative Aktivität in über 90% der mehr als 140 getesteten Zelllinien aufweist. Dieser neuartige Inhibitor hemmte die CK2-Kinaseaktivität bei gleichen Konzentrationen effizienter als der häufig verwendete Inhibitor CX-4945. Daher erscheint dieser Inhibitor besser geeignet, um CK2-abhängige Effekte in Zellen zu analysieren (Wells et al., 2021).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von SGC-CK2-1 im Vergleich zu dem etablierten Hemmstoff CX-4945 auf die Zellviabilität, Kinaseaktivität, Protein-Expression sowie Insulinproduktion und -sekretion in pankreatischen Beta-Zellen untersucht. Durch den Vergleich an diesem bekannten Modellsystem sollte sichergestellt werden, dass die Effekte von SGC-CK2-1 mit denen des etablierten Hemmstoffs CX-4945 übereinstimmen, bevor der neue Inhibitor in Alpha-Zellen getestet wird. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Inhibitoren nur eine geringfügige Reduktion der Zellviabilität bewirkten, wobei eine Reduktion um etwa 10-15% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet wurde. Die Ergebnisse für CX-4945 in MIN6-Zellen stimmen mit früheren Beobachtungen überein. Intemann et al. stellten ebenfalls fest, dass CX-4945 die CK2-Kinaseaktivität reduzierte, jedoch keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität hatte (Intemann et al., 2014).

Die Aktivität von CK2 reguliert die Phosphorylierung von nachgeschalteten Signalmolekülen, so zum Beispiel Akt, das an Serin129 von CK2 phosphoryliert wird. (Di Maira et al., 2005; Girardi et al., 2014). Diese Phosphorylierung von Akt kann mittels eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die CK2-Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden und ist daher ein Maß für die intrazelluläre CK2-Aktivität. Wie gezeigt wurde, wird die Phosphorylierung von Akt an Serin129 durch beide Inhibitoren gehemmt. SGC-CK2-1 zeigte in MIN6-Zellen bereits bei einer Konzentration von 1 μM Wirkung, während CX-4945 eine starke Hemmung der Akt-129-Phosphorylierung erst bei einer Konzentration von 10 μM bewirkte. Eine dosisabhängige Reduktion der Phosphorylierung an Serin129 konnte bereits in Tumorzellen, zum Beispiel Akute myeloische Leukämie (AML)-Zellen sowie bei der Verwendung eines Peptids mit der CK2-Konsensussequenz RRRDDDSDDD als Substrat beobachtet werden (Klink et al., 2021; Münstermann et al., 1990; Siddiqui-Jain et al., 2010).

In der Western Blot-Analyse wurde zudem gezeigt, dass weder SGC-CK2-1 noch CX-4945 die Protein-Expression von CK2 α und CK2 β beeinflussen. Daher kann die beobachtete Reduktion der CK2-Kinaseaktivität nicht durch eine Verringerung der CK2-Protein-Expression erklärt werden. In dieser Arbeit wurde mittels qRT-PCRs und Western Blots gezeigt, dass beide Inhibitoren die Gen- und Protein-Expression von Pro-Insulin, dem Vorläufer des Insulins, stimulieren. Die mRNA-Expression von Pro-Insulin war unter beiden Inhibitoren signifikant erhöht, wobei höhere Dosen jeweils zu

einer stärkeren Genexpression führten. Die Pro-Insulin Protein-Expression war nach Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren nur geringfügig erhöht. Interessanterweise scheint SGC-CK2-1 effektiver zu sein als CX-4945, insbesondere bei einer Konzentration von 10 μM . Diese geringe Steigerung der Protein-Expression deutet zudem darauf hin, dass die mRNA-Expression nicht direkt in eine proportional erhöhte Protein-Expression umgesetzt wird. Dies könnte auf posttranskriptionale Regulationen oder eine stärkere Wirkung von SGC-CK2-1 auf die Proteinsynthese hinweisen.

Scheuer et al. konnten zudem zeigen, dass nicht nur die Synthese von Insulin nach CK2-Hemmung erhöht war, sondern auch die Sekretion von Insulin, was mit einer Modulation der $\text{CaV}_{2.1}$ -abhängigen Calciumströme in pankreatischen Beta-Zellen einhergeht (Scheuer et al., 2020). In dieser Arbeit wurde mittels ELISA-Assay festgestellt, dass beide Inhibitoren zu einer gesteigerten Insulin-Sekretion führen. Diese erhöhte Insulin-Sekretion könnte erklären, warum die Protein-Expression von Insulin nicht signifikant erhöht ist. Es könnte darauf hinweisen, dass die gesteigerte Insulin-Sekretion durch die Hemmung von CK2 zu einer schnellen Freisetzung des vorhandenen Insulins führt, ohne dass eine bedeutende Erhöhung der Protein-Expression von Insulin erforderlich ist. Zusammenfassend legen die bisherigen Ergebnisse nahe, dass die gesteigerte Expression und Sekretion von Insulin aus pankreatischen Beta-Zellen spezifisch auf die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität zurückzuführen ist und nicht auf Off-Target-Effekte. Die Ergebnisse heben die Wirksamkeit von SGC-CK2-1 als spezifischen CK2-Inhibitor hervor und bestätigen dessen Eignung für den Einsatz in zukünftigen Experimenten, um den Einfluss einer CK2-Inhibition auf die Glukosehomöostase zu untersuchen. Gleichzeitig wird jedoch die Notwendigkeit eines gezielten Knockouts der CK2 α -Untereinheit deutlich, um Off-Target-Effekte, die durch die Verwendung von Inhibitoren entstehen könnten, zu vermeiden und präzisere Erkenntnisse zu gewinnen. Ein Knockout könnte nämlich aufdecken, ob andere Signalwege oder Proteine kompensatorisch aktiviert werden, ein Effekt, der durch Inhibitoren möglicherweise nicht in vollem Umfang ausgelöst wird. Stimmen die Ergebnisse des Knockouts mit denen der Inhibitoren überein, würde dies die Evidenz stärken, dass die CK2 tatsächlich für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

8.2 Einfluss einer CK2 Inhibition und Knockout von CK2 α auf die GCG-Expression in α TC1-Zellen

Angesichts der zentralen Rolle, die die Proteinkinase CK2 in der Regulation von Insulin spielt, stellt sich die Frage, wie diese Kinase auch andere hormonelle Prozesse im Pankreas beeinflussen könnte. Ein besonders interessantes Ziel ist hierbei die Untersuchung des Einflusses von CK2 auf die GCG-Expression. GCG, ein weiteres wichtiges Hormon, das von den Alpha-Zellen des Pankreas produziert wird, wirkt antagonistisch zu Insulin und ist wesentlich für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase (Campbell & Drucker, 2015; Charron & Vuguin, 2015; Gromada et al., 2007; Jiang & Zhang, 2003a; Unger & Orci, 1976; Wendt & Eliasson, 2022). Während GCG und Insulin in verschiedenen Zelltypen des Pankreas produziert werden, beeinflussen gemeinsame regulatorische Mechanismen beide Hormone. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist der Transkriptionsfaktor PDX1, der nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Erhöhung der Insulin-Expression spielt, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Identität der Beta- und Alpha-Zellen zuständig ist. Ein bemerkenswerter Aspekt ist, dass PDX1 zudem ein Substrat der CK2 ist (Ahlgren et al., 1998; Gao et al., 2014; Holland et al., 2002; Kaneto et al., 2008; Klein et al., 2017; Meng, Al-Quobaili, et al., 2010; Spohrer et al., 2017). Während in Beta-Zellen eine hohe Menge an PDX1 exprimiert wird (Ebrahim et al., 2022; Sachdeva et al., 2009; Szabat et al., 2009), lässt sich in Alpha-Zellen nur ein geringer Proteingehalt nachweisen (Blodgett et al., 2015). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass PDX1 als Hauptregulator der Funktion der Beta-Zellen fungiert, indem es gleichzeitig Gene aktiviert, die für die Beta-Zell-Identität essentiell sind, und jene unterdrückt, die mit der Alpha-Zell-Identität assoziiert sind. Darüber hinaus demonstrierten Ritz-Laser et al., dass die ektopische Expression von PDX1 in Alpha-Zellen zu einer Hemmung der GCG-Expression führt (Ritz-Laser et al., 2003) und Guo et al. konnten Alpha-Zellen mittels ektopischer Expression von PDX1 und MafA zu Insulin-produzierenden Zellen umprogrammieren (Guo et al., 2023).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss der CK2 auf die GCG-Expression in Alpha-Zellen untersucht, um das Verständnis für die Rolle der CK2 in der Regulation der Glukosehomöostase zu vertiefen und den zugrundeliegenden Mechanismus zu identifizieren. Angesichts der bekannten Auswirkungen von Inhibitoren auf die Zellviabilität (Qaiser et al., 2014; Ruzzene et al.,

2002) wurde zunächst untersucht, wie sich die verwendeten Inhibitoren im Vergleich zu einem CRISPR/Cas9-generierten CK2 α -Knockout auf die Viabilität und Proliferation in der verwendeten α TC1-Zelllinie auswirken. Abgesehen von einer Dosis-abhängigen reduzierten Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen im WST-Assay, sowie einer leicht reduzierten Zellproliferation, konnte kein Unterschied bezüglich der Viabilität zwischen den Inhibitoren und dem Knockout von CK2 α verzeichnet werden. Die verminderte Proliferation kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die CK2 für die Phosphorylierung zahlreicher Proteine verantwortlich ist, die im Zellzyklus involviert sind, einschließlich Regulatoren wie M-phase inducer phosphatase 2 (CDC25b), Phosphoprotein-Phosphatase 2A (PP2A), Histone deacetylase 1/2 (HDAC1/2) und Topoisomerase II α/β (Bandyopadhyay et al., 2012; Pluemsampant et al., 2008; Theis-Febvre et al., 2003). Es könnte zwar möglich sein, dass die verminderte Zellteilung auch die endokrine Funktion der α TC1-Zellen beeinflusst, es sei jedoch darauf hingewiesen, dass es in den Langerhans-Inseln von Erwachsenen keine proliferierenden Alpha-Zellen gibt (Lam et al., 2018).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Hemmung oder der Knockout der katalytischen CK2 α -Untereinheit die Expression und Sekretion von GCG signifikant reduziert. Eine zudem verringerte Genexpression deutete darauf hin, dass die CK2-abhängige Regulation auf Promotorebene stattfindet. Der GCG-Promotor selbst ist gut erforscht, er besteht aus fünf Kontrollelementen (G1-G5), wobei die Elemente G2, G3 und G5 die Enhancer Region und G1 und G4 den Minimal Promotor darstellen (Gosmain et al., 2011; Leung-Theung-Long et al., 2005). Diese Elemente sind entscheidend für die Regulation der Gen-Expression von GCG, da sie als spezifische Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dienen.

Viele Studien haben PAX6 bereits als einen der wichtigsten aktivierenden Transkriptionsfaktoren identifiziert, der für die Regulation der GCG-Expression entscheidend ist. Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine zentrale regulatorische Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Identität von Alpha-Zellen im Pankreas (Ashery-Padan et al., 2004; Brooks & Sussel, 2023; Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997). Die regulatorische Funktion von PAX6 umfasst ebenfalls die Interaktion mit anderen aktivierenden Faktoren wie MafB und die Bindung an spezifische DNA-Elemente wie das G1-Element des GCG-Promotors, was zu dessen Aktivierung führt (Gosmain et al., 2007, 2011; Jin, 2008; Katoh et al., 2018). Interessanterweise

resultierte in der vorliegenden Arbeit eine CK2 Inhibition in einer verminderten Bindung der Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB an den GCG-Promotor. Obwohl die Proteinkinase CK2 mit über 500 Substraten in zahlreiche Prozesse und Signalwege involviert ist, indem sie die Aktivität von Proteinen durch Phosphorylierungen verändert (Ampofo et al., 2013; Apopa et al., 2008; Gibson et al., 2018; González et al., 2016; Iyengar et al., 2012; Ren et al., 2011; Schwind et al., 2015), wurden die Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB nicht als solche Substrate identifiziert. Des Weiteren ergaben in silico-Analysen keine deutlichen CK2-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Polypeptidketten von PAX6 und MafB (www.phosphosite.org, <https://scansite4.mit.edu>).

Daher wurde angenommen, dass die reduzierte Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren an den GCG-Promotor nicht auf eine direkte CK2-abhängige Phosphorylierung dieser Faktoren am Promotor zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine mögliche Verdrängung der Transkriptionsfaktoren vom Promotor. Verschiedene Beobachtungen legen nahe, dass eine Phosphorylierung durch CK2 in der Nähe eines Kernlokalisierungssignals den Import von Proteinen in den Zellkern beeinflusst, was diese Hypothese unterstützt (Apopa et al., 2008; Jans & Jans, 1994; Panasyuk et al., 2006; Schwindling et al., 2004). Aufgrund des Fehlens einer CK2-Phosphorylierungsstelle in der Nähe eines Kernlokalisierungssignals der Polypeptidkette von MafB wird angenommen, dass die CK2 Inhibition nicht für die Veränderung der subzellulären Lokalisation von MafB verantwortlich ist. Es können jedoch sekundäre Effekte einer CK2 Inhibition auf die Lokalisation von MafB nicht ausgeschlossen werden.

Tatsächlich ist der Beta-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor PDX1 in der Lage, an derselben Stelle am G1-Element des GCG-Promotors zu binden wie PAX6 mit einer ähnlichen Affinität (Gosmain et al., 2011). Darüber hinaus zeigte die Studie von Ritz-Laser et al., dass eine ektopische Expression von PDX1 in Alpha-Zellen die GCG-Expression reduziert. Es ist zudem bekannt, dass die Phosphorylierung von PDX1 an den Stellen Threonin231 und Serin232 durch das Enzym CK2 dessen Aktivität verringert und den Abbau beschleunigt (Klein et al., 2017; Meng, Al-Quobaili, et al., 2010; Meng, Götz, et al., 2010; Welker et al., 2013).

Folglich könnte eine CK2 Inhibition in einer gesteigerten Aktivität des PDX1 resultieren, welches in der Lage ist, PAX6 und MafB vom Promotor zu verdrängen. Die

vorliegenden Ergebnisse stützen diese Annahme, da die durchgeführten *in vitro* Experimente zeigten, dass sowohl die CK2 Inhibition als auch der Knockout von CK2 α nicht nur zu einer erhöhten nucleären Protein-Expression von PDX1 führten, sondern auch die Pull-Down-Assays eine verstärkte Bindung an den GCG-Promotor aufzeigten. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf die veränderte Aktivität anderer CK2-Substrate zurückzuführen sind, wurden ein PDX1-Wildtyp sowie eine CK2-Phosphorylierungsmutante (PDX1 Mut, T231A/S232A) in α TC1-Zellen transfiziert (Klein et al., 2017). Auch hier zeigte sich eine signifikant reduzierte GCG-Expression. Das Einbringen von PDX1 Mut führte dabei zu keiner Veränderung der GCG-Expression, da keine aktive CK2 vorhanden war, die diesen Transkriptionsfaktor phosphorylieren konnte. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass eine CK2-Inhibition oder ein Knockout der CK2 α die transkriptionelle Aktivität von PDX1 erhöht und zur Verdrängung von PAX6 und MafB am GCG-Promotor führt.

Es ist bekannt, dass Beta-Zellen im direkten Kontakt zu Alpha-Zellen stehen und das sezernierte Insulin die GCG-Sekretion durch direkte Bindung an den IR auf Alpha-Zellen unterdrücken kann (Capozzi et al., 2022; Cooperberg & Cryer, 2010; Elliott et al., 2015; Ionescu-Tirgoviste et al., 2015; Maruyama et al., 1984; Müller et al., 2017; Unger & Orci, 2010). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch in diesem Modell das sezernierte Insulin die GCG-Sekretion negativ beeinflusst. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen und sicherzustellen, dass die verminderte GCG-Sekretion nicht allein durch die Insulin-Sekretion, sondern durch die CK2 Inhibition bedingt ist, wurden Langerhans-Inseln sowie PI zusätzlich mit Linsitinib behandelt, einem Inhibitor des Insulin-Like Growth Factor (IGF)-1R. Die zusätzliche Behandlung mit Linsitinib zeigte, dass der parakrine Effekt von Insulin nur zu einer geringfügigen Reduktion der GCG-Sekretion führte. Daher wurde angenommen, dass die CK2-abhängige Stabilisierung von PDX1 die Hauptursache für die beobachtete Reduktion darstellt.

Eine durch Hypoglykämie verursachte erhöhte GCG-Sekretion führt zu einer gesteigerten Glukoneogenese und einer vermehrten Freisetzung von Glukose aus der Leber (Jiang & Zhang, 2003; MacDonald & Rorsman, 2023; Wasserman et al., 1989). Um die Auswirkungen der CK2-Hemmung auf die GCG-vermittelte Regulation des Blutglukosespiegels zu untersuchen, wurde das Nierenkapsel-Modell verwendet (Wrublewsky et al., 2022). Mäuse, die α TC1-Zelltransplantate erhielten, zeigten im Vergleich zu Mäusen, die keine Zellen oder α TC1 CK2 α KO-Zellen transplantiert

bekamen, nach dem Fasten erhöhte Nüchternblutglukosespiegel, höhere GCG-Spiegel und niedrigere Insulin-Spiegel im Serum. Dies unterstreicht die Bedeutung der CK2 für die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Glukosestoffwechsels und deutet darauf hin, dass die CK2 in den pankreatischen Alpha-Zellen eine entscheidende Rolle spielt, um eine Hypoglykämie zu verhindern und den Blutglukosespiegel zu regulieren. Obwohl GCG und CK2 α evolutionär stark konservierte Gene sind, könnten sich aufgrund der unterschiedlichen zellulären Zusammensetzung und intra-zellulären Interaktionen zwischen menschlichen und murinen Inseln unterschiedliche Regulationsmechanismen in den Alpha-Zellen entwickelt haben. Humane Pankreasinseln haben tendenziell ein geringeres Verhältnis von Beta- zu Alpha-Zellen im Vergleich zu Nagetierinseln. Zudem sind humane Inseln tendenziell größer und weniger gleichmäßig verteilt als die von Nagetieren. Im Gegensatz zu humanen Inseln, weisen murine Inseln einen Kern auf, welcher hauptsächlich aus Beta-Zellen besteht, sowie einen Mantel, in dem die restlichen Inselzellen lokalisiert sind (Kilimnik et al., 2012; Kim et al., 2009; Steiner et al., 2010; X. Wang et al., 2013). Trotz dieser Unterschiede konnte die reduzierte GCG-Sekretion nach CK2 Inhibition ebenfalls in humanen Inseln reproduziert werden.

8.3 Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die GCG-Expression in α TC1-Zellen

In den bisherigen Experimenten wurde die CK2-Inhibition durch die Inhibitoren CX-4945 und SGC-CK2-1 erzielt, die den gesamten CK2-Proteinkomplex hemmen. Zusätzlich wurde in der α TC1 CK2 α KO-Zelllinie ausschließlich CK2 α ausgeschaltet. Jedoch ist es von großer Wichtigkeit auch den alleinigen Einfluss eines Knockouts von CK2 α' auf die GCG-Expression zu untersuchen, da die Funktion von CK2 α' in der Glukosehomöostase größtenteils unerforscht ist. Es ist bereits bekannt, dass die Untereinheiten verschiedene Rollen in Signalwegen und physiologischen Prozessen einnehmen. (Montenarh & Götz, 2023; St-Denis & Litchfield, 2009). Besonders Studien, die neurodegenerative Krankheiten wie Chorea Huntington untersuchen, stellen signifikante Unterschiede in der Expression der Untereinheiten in verschiedenen Hirnregionen fest (Bian et al., 2013; Gomez-Pastor et al., 2017; Villamañan et al., 2019; Yu et al., 2022). Daher ist die Entwicklung von CK2 α' -

spezifischen Inhibitoren von großer Bedeutung und stellt eine wesentliche Herausforderung dar (Mudaliar et al., 2024). Auch in den Alpha-Zellen des Pankreas könnte CK2 α' spezifische Funktionen ausüben, die sich von denen der CK2 α unterscheiden und daher möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen auf die Regulation von GCG haben. Für diese Untersuchungen, wurde eine Zelllinie mittels der CRISPR/Cas9-Methode generiert, die einen Knockout der CK2 α' aufweist.

Im Vergleich zur Zelllinie, bei der CK2 α ausgeschaltet wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität oder Proliferation. Eine leicht verringerte Zellproliferation im Vergleich zu wildtypischen α TC1-Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen. Interessanterweise führte ein Knockout von CK2 α' zu keiner verringerten Phosphorylierung von Akt an Serin129. In den bisherigen Studien, die die Phosphorylierung von Akt durch CK2 untersuchen, wird entweder speziell auf CK2 α fokussiert oder es wird keine Unterscheidung zwischen den CK2-Untereinheiten vorgenommen. (Di Maira et al., 2005; Girardi et al., 2014; Ponce et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass CK2 α die Hauptrolle bei der Phosphorylierung von Akt an Serin129 spielt, während CK2 α' in diesem spezifischen Prozess möglicherweise redundant ist. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass ein Knockout der CK2 α' zu einer signifikant gesteigerten GCG-Expression und -Sekretion führt. Analog zu den vorherigen Ergebnissen zeigte die veränderte Gen-Expression auch hier, dass diese Regulation am Promotor erfolgt. Während die nucleäre Protein-Expression von PAX6 nach Knockout von CK2 α' unverändert bleibt, zeigt die Expression von MafB eine deutliche Zunahme. Die darauffolgenden Pull-Down-Assays zeigten sowohl eine erhöhte Bindung von PAX6, als auch MafB an den GCG-Promotor nach Knockout von CK2 α' . Aufgrund der Tatsache, dass die nucleäre Protein-Expression von PAX6 unverändert bleibt, jedoch mehr PAX6 an den Promotor bindet, weist auf eine veränderte Aktivität des Proteins hin. Tatsächlich ist PAX6 ein Transkriptionsfaktor mit zahlreichen Interaktionspartnern, der in der Lage ist, verschiedene Proteinkomplexe zu bilden. Am G1-Element des GCG-Promotors bildet PAX6 einen Komplex mit den Transkriptionsfaktoren Cdx-2/3, MafB und cMaf, welcher für die Aktivierung des GCG-Promotors notwendig ist (Gosmain et al., 2007; Ritz-Laser et al., 1999). Zudem weist PAX6 noch eine weitere Bindestelle am G3-Element des Promotors auf und kann unter basalen Bedingungen dort ein Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor ALX3 bilden. Eine Erhöhung der ALX3-Expression als Reaktion auf eine erhöhte

Glukosekonzentration führt zur Sequestrierung von PAX6 durch ALX3 an das G1-Element, was die Aktivierung des GCG-Promotors und die Expression des GCG verringert (Gosmain et al., 2007; Hill et al., 1999; Jin & Drucker, 1996; Mirasierra & Vallejo, 2016; Planque et al., 2001; Ritz-Laser et al., 2000). Weitere Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls am G1-Element binden und die Komplexbildung des PAX6 beeinflussen können, sind BRN4 und HNF-3 (Gauthier et al., 2002; Hussain et al., 1997). Die Aktivität des GCG-Promotors beruht demnach auf komplexen Interaktionen zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Da keine der hier genannten Transkriptionsfaktoren, direkte Substrate der CK2 darstellen, werden in diesem Fall sekundäre Effekte vermutet. Es ist davon auszugehen, dass CK2 α' in negative Feedback-Mechanismen involviert ist, die normalerweise die GCG-Expression unterdrücken. Ein Knockout von CK2 α' könnte diese Feedback-Mechanismen stören und zu einer erhöhten GCG-Expression führen. Borgo et al. konnten außerdem nachweisen, dass ein Knockout von CK2 β unterschiedliche Effekte auf die Expression der CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten hat. Dies deutet stark darauf hin, dass ein Knockout der CK2-Untereinheiten wahrscheinlich die Stöchiometrie des gesamten Komplexes verändert, was wiederum die Interaktion mit spezifischen Substraten beeinflussen könnte (Borgo et al., 2017).

8.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig der neuartige CK2 Inhibitor SGC-CK2-1 mit dem bereits etablierten Inhibitor CX-4945 verglichen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Inhibitoren die Phosphorylierung von Akt an Serin129 hemmen, und sowohl SGC-CK2-1 als auch CX-4945 signifikant die Gen- und Protein-Expression von Pro-Insulin, dem Vorläufer des Insulins steigern. Zusammenfassend deuten die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass SGC-CK2-1 im Wesentlichen ähnliche Effekte wie CX-4945 erzielt und dabei durch seine höhere Spezifität möglicherweise geringere Off-Target-Effekte aufweist. Obwohl SGC-CK2-1 in vivo nicht stabil ist (Yang et al., 2023), ist es dennoch geeignet, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu erforschen.

Ein tieferes Verständnis der Mechanismen, die zu Hyper- und Hypoglykämie führen,

ist im Kontext der Glukosehomöostase von entscheidender Bedeutung. Hyperglykämie, wie sie etwa bei Diabetes mellitus auftreten kann, resultiert aus verschiedenen Störungen des Glukosestoffwechsels. Diese umfassen eine unzureichende Insulin- und GCG-Sekretion sowie Beeinträchtigungen bei der Aufnahme, Nutzung und Rückresorption von Glukose (Del Prato, 2009; Li et al., 2022; Oh et al., 2018; Solis-Herrera et al., 2021; Ye et al., 2019). Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten Medikamente entwickelt, die in verschiedene zelluläre Mechanismen eingreifen, um die Hyperglykämie zu reduzieren. Derzeit stehen mehrere Klassen von oral verfügbaren pharmakologischen Wirkstoffen zur Verfügung für die Therapie von T2D, darunter Sulfonylharnstoffe, Metformin, Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-4)-Inhibitoren und orale GCG-like Peptid-1 (GLP-1)-Rezeptoragonisten (Anson et al., 2023; Aroda & Ratner, 2018; Florentin et al., 2022; Nasri & Rafieian-Kopaei, 2014; Nauck et al., 2021; Saini et al., 2023; Seino et al., 2017; Sola et al., 2015). Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der CK2-Enzymaktivität eine positive Wirkung auf Hyperglykämie haben kann, indem sie die Expression und Sekretion von Insulin fördert (Meng et al., 2010; Rossi et al., 2015; Welker et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals nachgewiesen, dass eine CK2-Inhibition auch den Blutglukosespiegel senken kann, indem sie die Expression von GCG vermindert und somit die Gluconeogenese hemmt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die zentrale Rolle der CK2 in der Regulation des Blutzuckerspiegels und schaffen eine wichtige Grundlage für das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen. Dabei könnte eine CK2-Inhibition nicht nur Hyperglykämie positiv beeinflussen, sondern auch das Risiko einer Hypoglykämie mit sich bringen. Durch die reduzierte GCG-Expression wird die Glukosebereitstellung aus der Leber verringert, was die Fähigkeit des Körpers einschränken könnte, den Blutzuckerspiegel in Situationen niedriger Glukosewerte anzuheben. Diese doppelseitige Wirkung der CK2-Inhibition könnte auch bei spezifischen Erkrankungen wie Glucagonomen relevant sein, bei denen überhöhte Glucagonspiegel zur Hyperglykämie beitragen (Marini et al., 2024). Eine CK2-Hemmung könnte hier als potenzieller Ansatz dienen, um den GCG-Überschuss bei solchen Tumoren zu regulieren und die Glukosehomöostase wiederherzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem festgestellt, dass ein Knockout der CK2 α' -Untereinheit zu einer gesteigerten Expression von GCG führt, was auf eine komplexe und möglicherweise kompensatorische Rolle dieser Untereinheit in der Regulation des

Blutzuckerspiegels hindeutet. Diese unerwartete Erhöhung der GCG-Expression im CK2 α '-Knockout könnte wichtige Hinweise auf alternative Mechanismen liefern, durch die CK2 das GCG-Signal und damit die Glukosehomöostase beeinflusst. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bislang unklar und bedürfen weiterer Forschung, um die molekularen Prozesse besser zu verstehen, die diese Effekte hervorrufen. Die Abbildung (Abb. 32) veranschaulicht die verschiedenen Auswirkungen der CK2-Interaktion auf die GCG-Expression: Während der Knockout von CK2 α die GCG-Expression hemmt und so die Glukoneogenese reduziert, zeigt der Knockout von CK2 α ' eine gegenteilige Wirkung und steigert die GCG-Expression. Dieser Unterschied deutet auf spezifische Funktionen der CK2-Untereinheiten hin, die noch genauer untersucht werden müssen, um das komplexe Zusammenspiel von CK2 und seinen Interaktionspartnern in der Regulation des Glukosestoffwechsels vollständig zu verstehen. Zusätzlich zu den hier beschriebenen Effekten der CK2-Inhibition auf die Glukosehomöostase legen frühere Studien nahe, dass die gezielte Untersuchung von CK2-Interaktionspartnern wie Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 (FBP1), einem zentralen Enzym der Glukoneogenese, wertvolle Einblicke in den Kohlenstoffkreislauf und die Stoffwechselregulation bietet (Pack et al., 2022). FBP1 ist ein Schlüsselfaktor der Glukoseproduktion in der Leber, und seine Interaktion mit der CK2 könnte eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Glukoseproduktion spielen, insbesondere bei hyperglykämischen Zuständen.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen könnten zukünftige Untersuchungen die CK2-abhängigen Mechanismen noch detaillierter erforschen, um die komplexe Rolle von CK2 in der metabolischen Regulation weiter zu entschlüsseln. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf zusätzlichen Transkriptionsfaktoren liegen, die an der Regulation der GCG-Expression beteiligt sind.

Diese tiefergehenden Erkenntnisse könnten sowohl für die Behandlung hyperglykämischer Erkrankungen wie Diabetes als auch für die Risikobewertung potenzieller Hypoglykämien unter CK2-Inhibition von Bedeutung sein. Eine umfassendere Untersuchung von CK2-abhängigen Mechanismen und ihren Interaktionen würde nicht nur neue therapeutische Zielstrukturen für die Blutzuckerregulation aufzeigen, sondern auch dazu beitragen, das Risiko von Nebenwirkungen besser einzuschätzen, die durch eine CK2-Inhibition in der Regulation der Glukosehomöostase auftreten könnten.

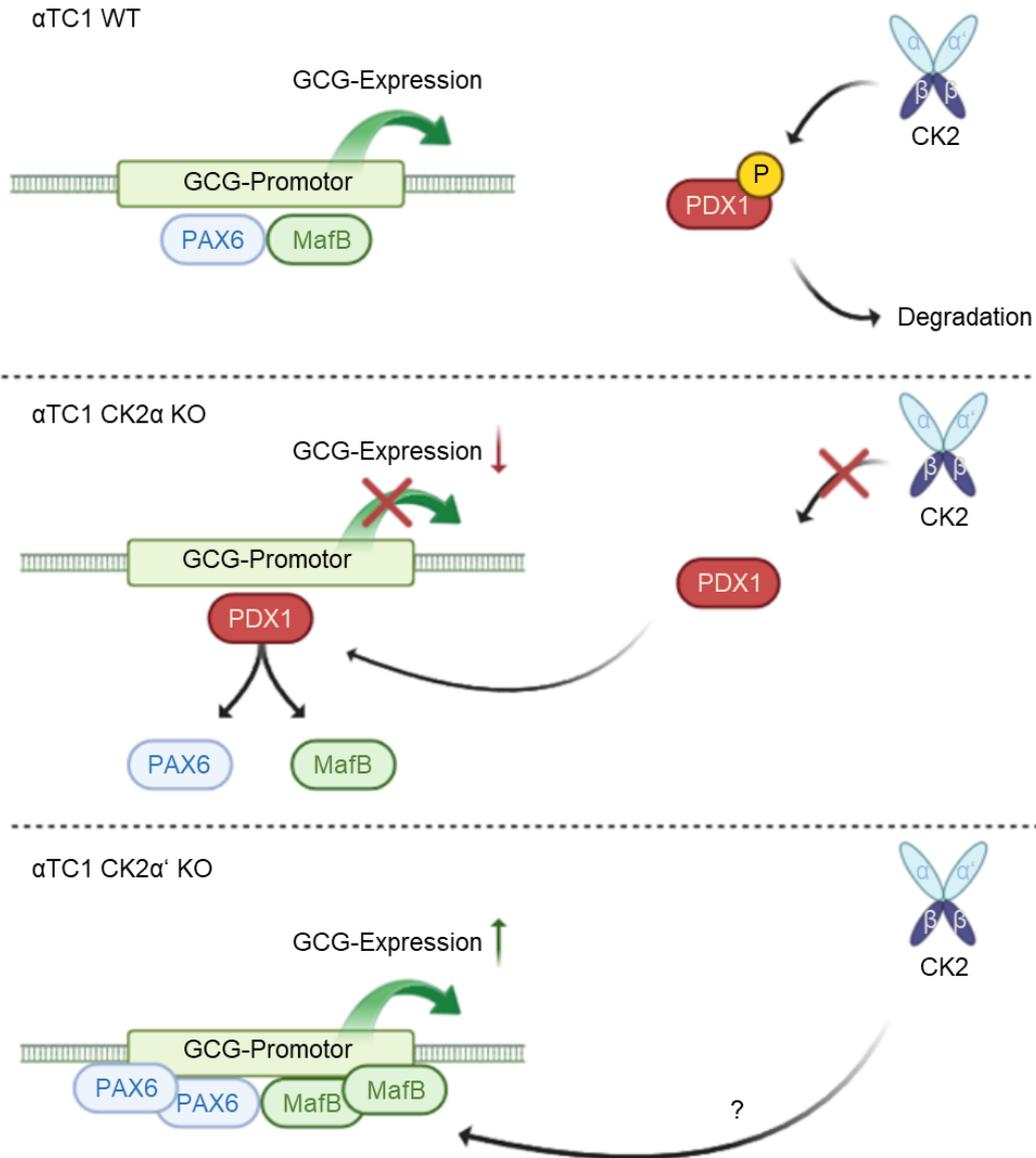


Abbildung 32: Der Einfluss von CK2 α und CK2 α' -Knockouts auf die GCG-Expression in α TC1-Zellen. α TC1 Wildtyp (WT): Die Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB binden an den GCG-Promotor und fördern somit die GCG-Expression. Eine Phosphorylierung von PDX1 mittels der Proteinkinase CK2 führt vermutlich zu dessen Degradation, es kommt zu keiner Bindung an den Promotor. **α TC1 CK2 α -Knockout (KO):** Ohne CK2 α fehlt die Phosphorylierung von PDX1. Dadurch wird die GCG-Expression reduziert, da PDX1 vermutlich die aktivierenden Transkriptionsfaktoren PAX6 und MafB vom GCG-Promotor verdrängt. **α TC1 CK2 α' -Knockout (KO):** In Abwesenheit von CK2 α' steigt die GCG-Expression. Dies könnte auf verstärkte Interaktionen der Transkriptionsfaktoren (PAX6 und MafB) am GCG-Promotor zurückzuführen sein. Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt.

9. Quellen

- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., & Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & development*, *12*(12), 1763–1768. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.12.1763>
- Ahmad, K. A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., & Ahmed, K. (2008). Protein Kinase CK2 - A Key Suppressor of Apoptosis. *Advances in enzyme regulation*, *48*(1), 179. <https://doi.org/10.1016/J.ADVENZREG.2008.04.002>
- Al Quobaili, F., & Montenarh, M. (2012). CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*, *61*(11), 1512–1517. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2012.07.011>
- Ampofo, E., Pack, M., Wrublewski, S., Boewe, A. S., Spigelman, A. F., Koch, H., MacDonald, P. E., Laschke, M. W., Montenarh, M., & Götz, C. (2024). CK2 activity is crucial for proper glucagon expression. *Diabetologia*, *67*(7), 1368–1385. <https://doi.org/10.1007/S00125-024-06128-1>
- Ampofo, E., Sokolowsky, T., Götz, C., & Montenarh, M. (2013). Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1833*(3), 439–451. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2012.10.025>
- Anson, M., Zhao, S. S., Austin, P., Ibarburu, G. H., Malik, R. A., & Alam, U. (2023). SGLT2i and GLP-1 RA therapy in type 1 diabetes and reno-vascular outcomes: a real-world study. *Diabetologia*, *66*(10), 1869–1881. <https://doi.org/10.1007/S00125-023-05975-8/TABLES/4>
- Apopa, P. L., He, X., & Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *22*(1), 63–76. <https://doi.org/10.1002/JBT.20212>
- Armour, S. L., Stanley, J. E., Cantley, J., Dean, E. D., & Knudsen, J. G. (2023). Metabolic regulation of glucagon secretion. *The Journal of endocrinology*, *259*(1), e230081. <https://doi.org/10.1530/JOE-23-0081>
- Aroda, V. R., & Ratner, R. E. (2018). Metformin and Type 2 Diabetes Prevention. *Diabetes Spectrum : A Publication of the American Diabetes Association*, *31*(4), 336. <https://doi.org/10.2337/DS18-0020>
- Ashery-Padan, R., Zhou, X., Marquardt, T., Herrera, P., Toubé, L., Berry, A., & Gruss, P. (2004). Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Developmental Biology*, *269*(2), 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.040>

- Bader, S., Scholz, R., Kellerer, M., Tippmer, S., Rett, K., Mathaei, S., Freund, P., & Häring, H. U. (1992). Normal insulin receptor tyrosine kinase activity and glucose transporter (GLUT 4) levels in the skeletal muscle of hyperinsulinaemic hypertensive rats. *Diabetologia*, *35*(8), 712–718. <https://doi.org/10.1007/BF00429089>
- Bandyopadhyay, K., Li, P., & Gjerset, R. A. (2012). CK2-Mediated Hyperphosphorylation of Topoisomerase I Targets Serine 506, Enhances Topoisomerase I–DNA Binding, and Increases Cellular Camptothecin Sensitivity. *PLoS ONE*, *7*(11), 50427. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050427>
- Bansal, P., & Wang, Q. (2008). Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *295*(4), 751–761. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90295.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10100854320003.JPEG>
- Bian, Y., Ye, M., Wang, C., Cheng, K., Song, C., Dong, M., Pan, Y., Qin, H., & Zou, H. (2013). Global Screening of CK2 Kinase Substrates by an Integrated Phosphoproteomics Workflow. *Scientific Reports*, *3*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep03460>
- Bibby, A. C., & Litchfield, D. W. (2005). The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2 β . *International Journal of Biological Sciences*, *1*(2), 67. <https://doi.org/10.7150/IJBS.1.67>
- Bischoff, N., Olsen, B., Raaf, J., Bretner, M., Issinger, O. G., & Niefind, K. (2011). Structure of the Human Protein Kinase CK2 Catalytic Subunit CK2 α' and Interaction Thermodynamics with the Regulatory Subunit CK2 β . *Journal of Molecular Biology*, *407*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2011.01.020>
- Blodgett, D. M., Nowosielska, A., Afik, S., Pechhold, S., Cura, A. J., Kennedy, N. J., Kim, S., Kucukural, A., Davis, R. J., Kent, S. C., Greiner, D. L., Garber, M. G., Harlan, D. M., & Dilorio, P. (2015). Novel observations from next-generation RNA sequencing of highly purified human adult and fetal islet cell subsets. *Diabetes*, *64*(9), 3172–3181. <https://doi.org/10.2337/DB15-0039/-/DC1>
- Borgo, C., Cesaro, L., Hirota, T., Kuwata, K., D'Amore, C., Ruppert, T., Blatnik, R., Salvi, M., & Pinna, L. A. (2021). Comparing the efficacy and selectivity of Ck2 inhibitors. A phosphoproteomics approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *214*, 113217. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113217>
- Borgo, C., Franchin, C., Scalco, S., Bosello-Travain, V., Donella-Deana, A., Arrigoni, G., Salvi, M., & Pinna, L. A. (2017). Generation and quantitative proteomics analysis of CK2 α/α' (-/-) cells. *Scientific Reports 2017*, *7*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42409>
- Borgo, C., Milan, G., Favaretto, F., Stasi, F., Fabris, R., Salizzato, V., Cesaro, L., Belligoli, A., Sanna, M., Foletto, M., Prevedello, L., Vindigni, V., Bardini, R.,

- Donella-Deana, A., & Vettor, R. (2017). CK2 modulates adipocyte insulin-signaling and is up-regulated in human obesity. *Scientific Reports*, 7(1), 17569. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-17809-W>
- Borgo, C., & Ruzzene, M. (2019). Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 287. <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1292-Y>
- Borgo, C., & Ruzzene, M. (2021). Protein kinase CK2 inhibition as a pharmacological strategy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 124, 23–46. <https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2020.09.003>
- Brooks, E. P., & Sussel, L. (2023). Not the second fiddle: α cell development, identity and function in health and diabetes. *The Journal of endocrinology*, 258(2), e220297. <https://doi.org/10.1530/JOE-22-0297>
- Campbell, J. E., & Drucker, D. J. (2015). Islet α cells and glucagon—critical regulators of energy homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology* 2015, 11(6), 329–338. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.51>
- Capozzi, M. E., D'Alessio, D. A., & Campbell, J. E. (2022). The past, present and future physiology and pharmacology of glucagon. *Cell metabolism*, 34(11), 1654. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2022.10.001>
- Cesaro, L., Zuliani, A. M., Travain, V. B., & Salvi, M. (2023). Exploring Protein Kinase CK2 Substrate Recognition and the Dynamic Response of Substrate Phosphorylation to Kinase Modulation. *Kinases and Phosphatases 2023*, 1(4), 251–264. <https://doi.org/10.3390/KINASESPHOSPHATASES1040015>
- Charron, M. J., & Vuguin, P. M. (2015). Lack of glucagon receptor signaling and its implications beyond glucose homeostasis. *The Journal of endocrinology*, 224(3), 123–130. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0614>
- Chon, H. J., Bae, K. J., Lee, Y., & Kim, J. (2015). The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies. *Frontiers in Pharmacology*, 6(1), 127137. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00070/BIBTEX>
- Chua, M. M. J., Ortega, C. E., Sheikh, A., Lee, M., Abdul-Rassoul, H., Hartshorn, K. L., & Dominguez, I. (2017). CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceuticals*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.3390/PH10010018>
- Claiborn, K. C., Sachdeva, M. M., Cannon, C. E., Groff, D. N., Singer, J. D., & Stoffers, D. A. (2010). Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic β cell function and survival in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3713–3721. <https://doi.org/10.1172/JCI40440>
- Cochet, C., & Chambazt, E. M. (1983). Communication Oligomeric Structure and Catalytic Activity of G Type Casein Kinase ISOLATION OF THE TWO

- SUBUNITS AND RENATURATION EXPERIMENTS*. *Journal of Biological Chemistry*, 258(3), 1403–1406. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32996-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32996-X)
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*, 17(20), 2591. <https://doi.org/10.1101/GAD.269003>
- Cooperberg, B. A., & Cryer, P. E. (2010). Insulin Reciprocally Regulates Glucagon Secretion in Humans. *Diabetes*, 59(11), 2936. <https://doi.org/10.2337/DB10-0728>
- Cozza, G., & Pinna, L. A. (2016). Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, 20(3), 319–340. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1091883>
- Cozza, G., Sarno, S., Ruzzene, M., Girardi, C., Orzeszko, A., Kazimierczuk, Z., Zagotto, G., Bonaiuto, E., Di Paolo, M. L., & Pinna, L. A. (2013). Exploiting the repertoire of CK2 inhibitors to target DYRK and PIM kinases. *Biochimica et biophysica acta*, 1834(7), 1402–1409. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2013.01.018>
- D'Amore, C., Borgo, C., Sarno, S., & Salvi, M. (2020). Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy – potential clinical relevance. *Cellular Oncology*, 43(6), 1003–1016. <https://doi.org/10.1007/S13402-020-00566-W/TABLES/3>
- Del Prato, S. (2009). Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic Medicine*, 26(12), 1185–1192. <https://doi.org/10.1111/J.1464-5491.2009.02847.X>
- Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L. A., & Ruzzene, M. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell death and differentiation*, 12(6), 668–677. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401604>
- Ebrahim, N., Shakirova, K., & Dashinimaev, E. (2022). PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(1), 1091757. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.1091757/FULL>
- Elliott, A. D., Ustione, A., & Piston, D. W. (2015). Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic α -cell by lowering cAMP. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 308(2), 130–143. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00344.2014>
- Fernández-Pérez, A., & Vallejo, M. (2014). Pdx1 and USF transcription factors coordinately regulate Alx3 gene expression in pancreatic β -cells. *The Biochemical journal*, 463(2), 287–296. <https://doi.org/10.1042/BJ20140643>
- Filhol, O., Martiel, J. L., & Cochet, C. (2004). Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Reports*, 5(4), 351. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400115>

- Florentin, M., Kostapanos, M. S., & Papazafiropoulou, A. K. (2022). Role of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the new era of antidiabetic treatment. *World Journal of Diabetes*, *13*(2), 85. <https://doi.org/10.4239/WJD.V13.I2.85>
- Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T., Stoffers, D. A., Edlund, H., Matschinsky, F., Stein, R., & Stanger, B. Z. (2014). Pdx1 maintains β -cell identity and function by repressing an α -cell program. *Cell metabolism*, *19*(2), 259. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.12.002>
- Gauthier, B. R., Schwitzgebel, V. M., Zaiko, M., Mamin, A., Ritz-Laser, B., & Philippe, J. (2002). Hepatic nuclear factor-3 (HNF-3 or Foxa2) regulates glucagon gene transcription by binding to the G1 and G2 promoter elements. *Molecular endocrinology*, *16*(1), 170–183. <https://doi.org/10.1210/MEND.16.1.0752>
- Gibson, S. A., Yang, W., Yan, Z., Qin, H., & Benveniste, E. N. (2018). CK2 Controls Th17 and Regulatory T Cell Differentiation Through Inhibition of FoxO1. *Journal of immunology*, *201*(2), 383–392. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1701592>
- Girardi, C., James, P., Zanin, S., Pinna, L. A., & Ruzzene, M. (2014). Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(9), 1865–1874. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.04.020>
- Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T., Neef, D. W., Jaeger, A. M., Cabisco, E., McKinstry, S. U., Doss, A., Aballay, A., Lo, D. C., Akimov, S. S., Ross, C. A., Eroglu, C., & Thiele, D. J. (2017). Abnormal degradation of the neuronal stress-protective transcription factor HSF1 in Huntington's disease. *Nature Communications*, *8*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms14405>
- González, N., Moresco, J. J., Cabezas, F., de la Vega, E., Bustos, F., Yates, J. R., & Olgún, H. C. (2016). Ck2-Dependent Phosphorylation Is Required to Maintain Pax7 Protein Levels in Proliferating Muscle Progenitors. *PLoS ONE*, *11*(5), e0154919. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0154919>
- Gosmain, Y., Avril, I., Mamin, A., & Philippe, J. (2007). Pax-6 and c-Maf functionally interact with the alpha-cell-specific DNA element G1 in vivo to promote glucagon gene expression. *The Journal of biological chemistry*, *282*(48), 35024–35034. <https://doi.org/10.1074/JBC.M702795200>
- Gosmain, Y., Cheyssac, C., Heddad Masson, M., Dibner, C., & Philippe, J. (2011). Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *13*(SUPPL. 1), 31–38. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2011.01445.X>
- Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C. J., & Monaco, A. P. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection.

- Transplantation*, 43(5), 725–730. <https://doi.org/10.1097/00007890-198705000-00024>
- Gowda, C., Soliman, M., Kapadia, M., Ding, Y., Payne, K., & Dovat, S. (2017). Casein Kinase II (CK2), Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) and Ikaros mediated regulation of leukemia. *Advances in biological regulation*, 65(1), 16-25. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2017.06.001>
- Gromada, J., Franklin, I., & Wollheim, C. B. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews*, 28(1), 84–116. <https://doi.org/10.1210/ER.2006-0007>
- Grygier, P., Pustelny, K., Nowak, J., Golik, P., Popowicz, G. M., Plettenburg, O., Dubin, G., Menezes, F., & Czarna, A. (2023). Silmitasertib (CX-4945), a Clinically Used CK2-Kinase Inhibitor with Additional Effects on GSK3 β and DYRK1A Kinases: A Structural Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(6), 4009–4024. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C01887/SUPPL_FILE/JM2C01887_SI_002.ZIP
- Guerra, B., & Issinger, O.-G. (2008). Protein kinase CK2 in human diseases. *Current medicinal chemistry*, 15(19), 1870–1886. <https://doi.org/10.2174/092986708785132933>
- Guo, P., Zhang, T., Lu, A., Shiota, C., Huard, M., Whitney, K. E., & Huard, J. (2023). Specific reprogramming of alpha cells to insulin-producing cells by short glucagon promoter-driven Pdx1 and MafA. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 28(1), 355. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2023.02.003>
- Halloran, D., Pandit, V., & Nohe, A. (2022). The Role of Protein Kinase CK2 in Development and Disease Progression: A Critical Review. *Journal of Developmental Biology*, 10(3), 31. <https://doi.org/10.3390/JDB10030031>
- Hanna, D. E., Rethinaswamy, A., & Glover, C. V. C. (1995). Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 270(43), 25905–25914. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.43.25905>
- Hill, M. E., Asa, S. L., & Drucker, D. J. (1999). Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(9), 1474–1486. <https://doi.org/10.1210/MEND.13.9.0340>
- Holland, A. M., Hale, M. A., Kagami, H., Hammer, R. E., & MacDonald, R. J. (2002). Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12236–12241. <https://doi.org/10.1073/PNAS.192255099>
- Humphrey, R. K., Yu, S. M., Flores, L. E., & Jhala, U. S. (2009). Glucose Regulates Steady-state Levels of PDX1 via the Reciprocal Actions of GSK3 and AKT

- Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3406.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109.006734>
- Hussain, M. A., Lee, J., Miller, C. P., & Habener, J. F. (1997). POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Molecular and cellular biology*, 17(12), 7186–7194.
<https://doi.org/10.1128/MCB.17.12.7186>
- Intemann, J., Saidu, N. E. B., Schwind, L., & Montenarh, M. (2014). ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945. *Cellular signalling*, 26(7), 1567–1575.
<https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2014.03.014>
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P. A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., & Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*, 5(1), 14634.
<https://doi.org/10.1038/SREP14634>
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J. I., & Oka, Y. (1993). Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia*, 36(11), 1139–1145.
<https://doi.org/10.1007/BF00401058>
- Iyengar, A. S., Loupe, J. M., Miller, P. J., & Hollenbach, A. D. (2012). Identification of CK2 as the Kinase that Phosphorylates Pax3 at Ser209 in Early Myogenic Differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 428(1), 24. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.09.141>
- James, D. E., Strube, M., & Muecdler, M. (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*, 338(1), 83–87. <https://doi.org/10.1038/338083A0>
- Jans, D. A., & Jans, P. (1994). Negative charge at the casein kinase II site flanking the nuclear localization signal of the SV40 large T-antigen is mechanistically important for enhanced nuclear import. *Oncogene*, 9(10), 2961–2968.
<https://europepmc.org/article/med/8084599>
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(4), 671-678.
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00492.2002>
- Jin, T. (2008). Mechanisms underlying proglucagon gene expression. *The Journal of endocrinology*, 198(1), 17–28. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0085>
- Jin, T., & Drucker, D. J. (1996). Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein cdx-2/3. *Molecular and cellular biology*, 16(1), 19–28.
<https://doi.org/10.1128/MCB.16.1.19>

- Kalathur, M., Toso, A., Chen, J., Revandkar, A., Danzer-Baltzer, C., Guccini, I., Alajati, A., Sarti, M., Pinton, S., Brambilla, L., Di Mitri, D., Carbone, G., Garcia-Escudero, R., Padova, A., Magnoni, L., Tarditi, A., Maccari, L., Malusa, F., Kalathur, R. K. R., ... Alimonti, A. (2015). A chemogenomic screening identifies CK2 as a target for pro-senescence therapy in PTEN-deficient tumours. *Nature communications*, 6(1), 7227. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS8227>
- Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Katakami, N., Yamasaki, Y., & Matsuhisa, M. (2008). PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13(16), 6406–6420. <https://doi.org/10.2741/3162>
- Katoh, M. C., Jung, Y., Ugboma, C. M., Shimbo, M., Kuno, A., Basha, W. A., Kudo, T., Oishi, H., & Takahashi, S. (2018). MafB Is Critical for Glucagon Production and Secretion in Mouse Pancreatic α Cells In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 38(8), e00504-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00504-17>
- Katoh, N., & Kubo, S. (1983). Purification and properties of cyclic nucleotide-independent phosphatase kinase from pig testis. *BBA - General Subjects*, 760(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90124-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90124-1)
- Kilimnik, G., Jo, J., Periwal, V., Zielinski, M. C., & Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets*, 4(2), 167–172. <https://doi.org/10.4161/ISL.19256>
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129–136. <https://doi.org/10.4161/ISL.1.2.9480>
- Kim, H., Choi, K., Kang, H., Lee, S. Y., Chi, S. W., Lee, M. S., Song, J., Im, D., Choi, Y., & Cho, S. (2014). Identification of a Novel Function of CX-4945 as a Splicing Regulator. *PLoS ONE*, 9(4), 94978. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094978>
- Klein, S., Meng, R., Montenarh, M., & Götz, C. (2017). The Phosphorylation of PDX-1 by Protein Kinase CK2 Is Crucial for Its Stability. *Pharmaceuticals*, 10(1), 2. <https://doi.org/10.3390/PH10010002>
- Klink, M., Rahman, M. A., Song, C., Dhanyamraju, P. K., Ehudin, M., Ding, Y., Steffens, S., Bhadauria, P., Iyer, S., Aliaga, C., Desai, D., Huang, S., Claxton, D., Sharma, A., & Gowda, C. (2021). Mechanistic Basis for In Vivo Therapeutic Efficacy of CK2 Inhibitor CX-4945 in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*, 13(5), 1127. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13051127>
- Lam, C. J., Cox, A. R., Jacobson, D. R., Rankin, M. M., & Kushner, J. A. (2018). Highly Proliferative α -Cell-Related Islet Endocrine Cells in Human Pancreata. *Diabetes*, 67(4), 674–686. <https://doi.org/10.2337/DB17-1114>
- Lee, D. S., Lee, S., Kim, C., Kim, D., Kim, K. P., & Yoo, C. (2022a). The Casein Kinase 2 Inhibitor CX-4945 Promotes Cholangiocarcinoma Cell Death Through

- PLK1. *Anticancer research*, 42(7), 3435–3443.
<https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.15830>
- Lee, D. S., Lee, S., Kim, C., Kim, D., Kim, K. P., & Yoo, C. (2022b). The Casein Kinase 2 Inhibitor CX-4945 Promotes Cholangiocarcinoma Cell Death Through PLK1. *Anticancer Research*, 42(7), 3435–3443.
<https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.15830>
- Lee, J. Y., Yun, J. S., Kim, W. K., Chun, H. S., Jin, H., Cho, S., & Chang, J. H. (2019). Structural Basis for the Selective Inhibition of Cdc2-Like Kinases by CX-4945. *BioMed research international*, 2019. 18(1), 6125068
<https://doi.org/10.1155/2019/6125068>
- Leung-Theung-Long, S., Roulet, E., Clerc, P., Escriet, C., Marchal-Victorion, S., Ritz-Laser, B., Philippe, J., Pradayrol, L., Seva, C., Fourmy, D., & Dufresne, M. (2005). Essential interaction of Egr-1 at an islet-specific response element for basal and gastrin-dependent glucagon gene transactivation in pancreatic α -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7976–7984.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M407485200>
- Li, M., Chi, X., Wang, Y., Setrerrahmane, S., Xie, W., & Xu, H. (2022). Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01073-0>
- Litchfield, D. W., & Lüscher, B. (1993). Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Molecular and cellular biochemistry*, 127(1), 187–199. <https://doi.org/10.1007/BF01076770>
- Liu, A., Oliver-Krasinski, J., & Stoffers, D. A. (2006). Two conserved domains in PCIF1 mediate interaction with pancreatic transcription factor PDX-1. *FEBS letters*, 580(28–29), 6701–6706. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.11.021>
- Lolli, G., Pinna, L. A., & Battistutta, R. (2012). Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. *ACS Chemical Biology*, 7(7), 1158–1163.
https://doi.org/10.1021/CB300054N/SUPPL_FILE/CB300054N_SI_001.PDF
- Lupp, S., Götz, C., Khadouma, S., Horbach, T., Dimova, E. Y., Bohrer, A. M., Kietzmann, T., & Montenarh, M. (2014). The upstream stimulatory factor USF1 is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation. *Cellular signalling*, 26(12), 2809–2817. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2014.08.028>
- Lv, S., Qiu, X., Li, J., Liang, J., Li, W., Zhang, C., Zhang, Z. N., & Luan, B. (2017). Glucagon-induced extracellular cAMP regulates hepatic lipid metabolism. *The Journal of endocrinology*, 234(2), 73–87. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0649>
- MacDonald, P. E., & Rorsman, P. (2023). Metabolic Messengers: glucagon. *Nature Metabolism*, 5(2), 186–192. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00725-3>

- Marin, O., Meggio, F., & Pinna, L. A. (1994). Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. *Biochemical and biophysical research communications*, 198(3), 898–905. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1994.1128>
- Marini, F., Giusti, F., & Brandi, M. L. (2024). Genetic disorders and insulinoma/glucagonoma. *Endocrine-Related Cancer*, 31(5), e230245. <https://doi.org/10.1530/ERC-23-0245>
- Marschke, R. F., Borad, M. J., McFarland, R. W., Alvarez, R. H., Lim, J. K., Padgett, C. S., Hoff, D. D. Von, O'Brien, S. E., & Northfelt, D. W. (2011). Findings from the phase I clinical trials of CX-4945, an orally available inhibitor of CK2. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 3087. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.29.15_SUPPL.3087
- Maruyama, H., Hisatomi, A., Orci, L., Grodsky, G. M., & Unger, R. H. (1984). Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *Journal of Clinical Investigation*, 74(6), 2296. <https://doi.org/10.1172/JC1111658>
- Meggio, F., & Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(3), 349–368. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-0473REV>
- Meng, R., Al-Quobaili, F., Müller, I., Götz, C., Thiel, G., & Montenarh, M. (2010). CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(14), 2481–2489. <https://doi.org/10.1007/S00018-010-0348-0>
- Meng, R., Götz, C., & Montenarh Mathias, M. (2010). The role of protein kinase CK2 in the regulation of the insulin production of pancreatic islets. *Biochemical and biophysical research communications*, 401(2), 203–206. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.09.028>
- Mirasierra, M., & Vallejo, M. (2016). Glucose-dependent downregulation of glucagon gene expression mediated by selective interactions between ALX3 and PAX6 in mouse alpha cells. *Diabetologia*, 59(4), 766–775. <https://doi.org/10.1007/S00125-015-3849-4>
- Montenarh, M. (2010). Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell and tissue research*, 342(2), 139–146. <https://doi.org/10.1007/S00441-010-1068-3>
- Montenarh, M. (2014). Protein kinase CK2 and angiogenesis. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 23(2), 153–158. <https://doi.org/10.17219/ACEM/37040>
- Montenarh, M., & Götz, C. (2023). Protein Kinase CK2 α' , More than a Backup of CK2 α . *Cells*, 12(24), 2834. <https://doi.org/10.3390/CELLS12242834>
- Morris, A. (2018). Acute effects of glucagon on the liver. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(6), 323–323. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0011-7>

- Mudaliar, D., Mansky, R. H., White, A., Baudhuin, G., Hawkinson, J., Wong, H., Walters, M. A., & Gomez-Pastor, R. (2024). Identification of CK2 α ' selective inhibitors by the screening of an allosteric-kinase-inhibitor-like compound library. *bioRxiv*, 2024.01.18.576328. <https://doi.org/10.1101/2024.01.18.576328>
- Mueckler, M. (2001). Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 107(10), 1211. <https://doi.org/10.1172/JCI13020>
- Müller, T. D., Finan, B., Clemmensen, C., Di Marchi, R. D., & Tschöp, M. H. (2017). The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiological reviews*, 97(2), 721–766. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00025.2016>
- MÜNSTERMANN, U., FRITZ, G., SEITZ, G., YIPING, L., SCHNEIDER, H. R., & ISSINGER, O. -G. (1990). Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *European Journal of Biochemistry*, 189(2), 251–257. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1990.TB15484.X>
- Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Metformin: Current knowledge. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(7), 658. [/pmc/articles/PMC4214027/](https://doi.org/10.1016/j.pmc.2014.02.027)
- Nauck, M. A., Quast, D. R., Wefers, J., & Meier, J. J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Molecular metabolism*, 46(1), 101102. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2020.101102>
- Oh, Y. S., Bae, G. D., Baek, D. J., Park, E. Y., & Jun, H. S. (2018). Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 9(1), 384. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00384>
- Ojha, A., Ojha, U., Mohammed, R., Chandrashekar, A., & Ojha, H. (2019). Current perspective on the role of insulin and glucagon in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Pharmacology : Advances and Applications*, 11(1), 57. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S202614>
- Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, À., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., & Bartrons, R. (2001). PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 30–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01699-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01699-6)
- Ostertag, M. S., Messias, A. C., Sattler, M., & Popowicz, G. M. (2019). The Structure of the SPOP-Pdx1 Interface Reveals Insights into the Phosphorylation-Dependent Binding Regulation. *Structure*, 27(2), 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.005>
- Pack, M., Gulde, T. N., Völcker, M. V., Boewe, A. S., Wrublewsky, S., Ampofo, E., Montenarh, M., & Götz, C. (2022). Protein Kinase CK2 Contributes to Glucose

- Homeostasis by Targeting Fructose-1,6-Bisphosphatase 1. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 428. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010428>
- Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D. W., Filonenko, V., & Gout, I. T. (2006). Nuclear Export of S6K1 II Is Regulated by Protein Kinase CK2 Phosphorylation at Ser-17. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31188–31201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84032-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84032-2)
- Paredes-Flores, M. A., & Mohiuddin, S. S. (2020). Biochemistry, Glycogenolysis. *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119304>
- Pierre, F., Chua, P. C., O'Brien, S. E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Michaux, J., Nagasawa, J., Schwaebe, M. K., Stefan, E., Vialettes, A., Whitten, J. P., Chen, T. K., Darjania, L., Stansfield, R., Anderes, K., Bliesath, J., Drygin, D., Ho, C., ... Ryckman, D. M. (2011). Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8- carboxylic Acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(2), 635–654. https://doi.org/10.1021/JM101251Q/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JM-2010-01251Q_0012.GIF
- Pinna, L. A., & Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 („casein kinase-2“) and its implication in cell division and proliferation. *Progress in cell cycle research*, 3(1), 77–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5371-7_7
- Planque, N., Leconte, L., Coquelle, F. M., Benkhelifa, S., Martin, P., Felder-Schmittbuhl, M. P., & Saule, S. (2001). Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), 35751–35760. <https://doi.org/10.1074/JBC.M104523200>
- Pluemsampant, S., Safronova, O. S., Nakahama, K. I., & Morita, I. (2008). Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *International journal of cancer*, 122(2), 333–341. <https://doi.org/10.1002/IJC.23094>
- Ponce, D. P., Maturana, J. L., Cabello, P., Yefi, R., Niechi, I., Silva, E., Armisen, R., Galindo, M., Antonelli, M., & Tapia, J. C. (2011). Phosphorylation of AKT/PKB by CK2 is necessary for the AKT-dependent up-regulation of β -catenin transcriptional activity. *Journal of cellular physiology*, 226(7), 1953–1959. <https://doi.org/10.1002/JCP.22527>
- Powers, A. C., Efrat, S., Mojsov, S., Spector, D., Habener, J. F., & Hanahan, D. (1990). Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic alpha-like cell line derived from transgenic mouse tumor. *Diabetes*, 39(4), 406–414. <https://doi.org/10.2337/DIAB.39.4.406>
- Kaiser, F., Trembley, J. H., Kren, B. T., Wu, J. J., Naveed, A. K., & Ahmed, K. (2014). Protein kinase CK2 inhibition induces cell death via early impact on

- mitochondrial function*. *Journal of cellular biochemistry*, 115(12), 2103.
<https://doi.org/10.1002/JCB.24887>
- Raaf, J., Guerra, B., Neundorf, I., Bopp, B., Issinger, O. G., Jose, J., Pietsch, M., & Niefind, K. (2013). First structure of protein kinase CK2 catalytic subunit with an effective CK2 β -competitive ligand. *ACS Chemical Biology*, 8(5), 901–907.
https://doi.org/10.1021/CB3007133/SUPPL_FILE/CB3007133_SI_001.PDF
- Ramnanan, C. J., Edgerton, D. S., Kraft, G., & Cherrington, A. D. (2011). Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes, obesity & metabolism*, 13(1), 118. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2011.01454.X>
- Ren, K., Xiang, S., He, F., Zhang, W., Ding, X., Wu, Y., Yang, L., Zhou, J., Gao, X., & Zhang, J. (2011). CK2 phosphorylates AP-2 α and increases its transcriptional activity. *BMB reports*, 44(7), 490–495.
<https://doi.org/10.5483/BMBREP.2011.44.7.490>
- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), 561. <https://doi.org/10.1042/BJ20040752>
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B., & Philippe, J. (2000). The paired homeodomain transcription factor Pax-2 is expressed in the endocrine pancreas and transactivates the glucagon gene promoter. *The Journal of biological chemistry*, 275(42), 32708–32715. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005704200>
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Klages, N., Saule, S., & Philippe, J. (1999). Pax-6 and Cdx-2/3 Interact to Activate Glucagon Gene Expression on the G1 Control Element. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4124–4132.
<https://doi.org/10.1074/JBC.274.7.4124>
- Ritz-Laser, B., Gauthier, B. R., Estreicher, A., Mamin, A., Brun, T., Ris, F., Salmon, P., Halban, P. A., Trono, D., & Philippe, J. (2003). Ectopic expression of the beta-cell specific transcription factor Pdx1 inhibits glucagon gene transcription. *Diabetologia*, 46(6), 810–821. <https://doi.org/10.1007/S00125-003-1115-7>
- Rossi, M., De Azua, I. R., Barella, L. F., Sakamoto, W., Zhu, L., Cui, Y., Lu, H., Rebolz, H., Matschinsky, F. M., Doliba, N. M., Butcher, A. J., Tobin, A. B., & Wess, J. (2015). CK2 acts as a potent negative regulator of receptor-mediated insulin release in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), 6818–6824.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1519430112>
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177.
<https://doi.org/10.1002/CPHY.C130024>
- Ruzzene, M., Penzo, D., & Pinna, L. A. (2002). Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat

- cells. *The Biochemical journal*, 364(1), 41–47.
<https://doi.org/10.1042/BJ3640041>
- Sachdeva, M. M., Claiborn, K. C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D. N., Mirmira, R. G., & Stoffers, D. A. (2009). Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19090–19095.
https://doi.org/10.1073/PNAS.0904849106/SUPPL_FILE/0904849106SI.PDF
- Saini, K., Sharma, S., & Khan, Y. (2023). DPP-4 inhibitors for treating T2DM - hype or hope? an analysis based on the current literature. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10(1), 1130625. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2023.1130625>
- Sander, M., Neubüser, A., Kalamaras, J., Ee, H. C., Martin, G. R., & German, M. S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes & development*, 11(13), 1662–1673. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.13.1662>
- Sarno, S., Salvi, M., Battistutta, R., Zanotti, G., & Pinna, L. A. (2005). Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1754(1), 263–270.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2005.07.043>
- Scheuer, R., Philipp, S. E., Becker, A., Nalbach, L., Ampofo, E., Montenarh, M., & Götz, C. (2020). Protein Kinase CK2 Controls CaV2.1-Dependent Calcium Currents and Insulin Release in Pancreatic β -Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 1–16. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134668>
- Schuster, N., Prowald, A., Schneider, E., Scheidtmann, K. H., & Montenarh, M. (1999). Regulation of p53 mediated transactivation by the beta-subunit of protein kinase CK2. *FEBS letters*, 447(2), 160–166. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00273-2)
- Schwind, L., Zimmer, A. D., Götz, C., & Montenarh, M. (2015). CK2 phosphorylation of C/EBP δ regulates its transcription factor activity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 61(1), 81–89.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2015.02.004>
- Schwindling, S. L., Noll, A., Montenarh, M., & Götz, C. (2004). Mutation of a CK2 phosphorylation site in cdc25C impairs importin alpha/beta binding and results in cytoplasmic retention. *Oncogene*, 23(23), 4155–4165.
<https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1207566>
- Seino, S., Sugawara, K., Yokoi, N., & Takahashi, H. (2017). β -Cell signalling and insulin secretagogues: A path for improved diabetes therapy. *Diabetes, obesity & metabolism*, 19(1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/DOM.12995>
- Siddiqui-Jain, A., Drygin, D., Streiner, N., Chua, P., Pierre, F., O'Brien, S. E., Bliesath, J., Omori, M., Huser, N., Ho, C., Proffitt, C., Schwaebe, M. K., Ryckman, D. M., Rice, W. G., & Anderes, K. (2010). CX-4945, an Orally Bioavailable Selective

- Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy. *Cancer Research*, 70(24), 10288–10298. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1893>
- Sola, D., Rossi, L., Schianca, G. P. C., Maffioli, P., Bigliocca, M., Mella, R., Corliano, F., Paolo Fra, G., Bartoli, E., & Derosa, G. (2015). Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science : AMS*, 11(4), 840. <https://doi.org/10.5114/AOMS.2015.53304>
- Solis-Herrera, C., Triplitt, C., Cersosimo, E., & DeFronzo, R. A. (2021). *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>
- Song, C., Gowda, C., Pan, X., Ding, Y., Tong, Y., Tan, B. H., Wang, H., Muthusami, S., Ge, Z., Sachdev, M., Amin, S. G., Desai, D., Gowda, K., Gowda, R., Robertson, G. P., Schjerven, H., Muschen, M., Payne, K. J., & Dovat, S. (2015). Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia. *Blood*, 126(15), 1813. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-06-651505>
- Spohrer, S., Groß, R., Nalbach, L., Schwind, L., Stumpf, H., Menger, M. D., Ampofo, E., Montenarh, M., & Götz, C. (2017). Functional interplay between the transcription factors USF1 and PDX-1 and protein kinase CK2 in pancreatic β -cells. *Scientific Reports*. 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16590-0>
- St-Denis, N. A., & Litchfield, D. W. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(11), 1817–1829. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-9150-2>
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2(3), 135. <https://doi.org/10.4161/ISL.2.3.11815>
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., & Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*, 387(6631), 406–409. <https://doi.org/10.1038/387406A0>
- Study Details | Study of CX-4945 in Combination With Gemcitabine and Cisplatin for Frontline Treatment of Cholangiocarcinoma | ClinicalTrials.gov*. (o. J.). Abgerufen 18. Juni 2024, von <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02128282>
- Szabat, M., Luciani, D. S., Piret, J. M., & Johnson, J. D. (2009). Maturation of Adult β -Cells Revealed Using a Pdx1/Insulin Dual-Reporter Lentivirus. *Endocrinology*, 150(4), 1627–1635. <https://doi.org/10.1210/EN.2008-1224>
- Tang, S., Yuan, Y., Liu, Z., He, Y., & Pan, D. (2020). Casein kinase 2 inhibitor CX-4945 elicits an anti-Warburg effects through the downregulation of TAp73 and inhibits gastric tumorigenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(4), 686–691. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.07.116>

- Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B., & Baldin, V. (2003). Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene*, *22*(2), 220–232. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1206107>
- Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., & Ahmed, K. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *66*(11), 1858–1867. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-9154-Y>
- Unger, R. H., & Orci, L. (1976). Physiology and pathophysiology of glucagon. *Physiological reviews*, *56*(4), 778–826. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1976.56.4.778>
- Unger, R. H., & Orci, L. (2010). Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(37), 16009. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1006639107>
- Villamañan, L., Alcaraz, E., Pinna, L. A., Ruzzene, M., Itarte, E., Arús, C., Plana, M., & Candiota, A. P. (2019). Up-Regulation of the Alpha Prime Subunit of Protein Kinase CK2 as a Marker of Fast Proliferation in GL261 Cultured Cells. *Pathology Oncology Research : POR*, *25*(4), 1659–1663. <https://doi.org/10.1007/S12253-018-00567-Z>
- Wang, G., Unger, G., Ahmad, K. A., Slaton, J. W., & Ahmed, K. (2005). Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells--a potential approach to cancer therapy. *Molecular and cellular biochemistry*, *274*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1007/S11010-005-3077-1>
- Wang, H., Maechler, P., Ritz-Laser, B., Hagenfeldt, K. A., Ishihara, H., Philippe, J., & Wollheim, C. B. (2001). Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *The Journal of biological chemistry*, *276*(27), 25279–25286. <https://doi.org/10.1074/JBC.M101233200>
- Wang, X., Misawa, R., Zielinski, M. C., Cowen, P., Jo, J., Periwal, V., Ricordi, C., Khan, A., Szust, J., Shen, J., Millis, J. M., Witkowski, P., & Hara, M. (2013). Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE*, *8*(6), 67454. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067454>
- Wasserman, D. H., Spalding, J. A., Lacy, D. B., Colburn, C. A., Goldstein, R. E., & Cherrington, A. D. (1989). Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *257*(1) 108-117. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1989.257.1.E108>
- Welker, S., Götz, C., Servas, C., Laschke, M. W., Menger, M. D., & Montenarh, M. (2013). Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic β -cells and its interaction with PDX-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *45*(12), 2786–2795. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2013.10.002>

- Wells, C. I., Drewry, D. H., Pickett, J. E., Tjaden, A., Krämer, A., Müller, S., Gyenis, L., Menyhart, D., Litchfield, D. W., Knapp, S., & Axtman, A. D. (2021). Development of a potent and selective chemical probe for the pleiotropic kinase CK2. *Cell chemical biology*, 28(4), 546. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2020.12.013>
- Wendt, A., & Eliasson, L. (2022). Pancreatic alpha cells and glucagon secretion: Novel functions and targets in glucose homeostasis. *Current opinion in pharmacology*, 63(1) 102199. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2022.102199>
- Wilhelm, N., Kostelnik, K., Götz, C., & Montenarh, M. (2012). Protein kinase CK2 is implicated in early steps of the differentiation of pre-adipocytes into adipocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 365(1), 37–45. <https://doi.org/10.1007/S11010-012-1241-Y>
- Winther-Sørensen, M., Galsgaard, K. D., Santos, A., Trammell, S. A. J., Sulek, K., Kuhre, R. E., Pedersen, J., Andersen, D. B., Hassing, A. S., Dall, M., Treebak, J. T., Gillum, M. P., Torekov, S. S., Windeløv, J. A., Hunt, J. E., Kjeldsen, S. A. S., Jepsen, S. L., Vasilopoulou, C. G., Knop, F. K., ... Wewer Albrechtsen, N. J. (2020). Glucagon acutely regulates hepatic amino acid catabolism and the effect may be disturbed by steatosis. *Molecular Metabolism*, 42(1), 101080. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2020.101080>
- Wrublewsky, S., Weinzierl, A., Hornung, I., Prates-Roma, L., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Ampofo, E. (2022). Co-transplantation of pancreatic islets and microvascular fragments effectively restores normoglycemia in diabetic mice. *NPJ Regenerative medicine*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.1038/S41536-022-00262-3>
- Yde, C. W., Olsen, B. B., Meek, D., Watanabe, N., & Guerra, B. (2008). The regulatory β -subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis. *Oncogene*, 27(37), 4986–4997. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.146>
- Ye, R., Onodera, T., & Scherer, P. E. (2019). Lipotoxicity and β Cell Maintenance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Journal of the Endocrine Society*, 3(3), 617–631. <https://doi.org/10.1210/JS.2018-00372>
- Yin, Y., Tan, M., Han, L., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, J., Pan, W., Bai, J., Jiang, T., & Li, H. (2023). The hippo kinases MST1/2 in cardiovascular and metabolic diseases: A promising therapeutic target option for pharmacotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(5), 1956–1975. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2023.01.015>
- Yu, D., Zarate, N., White, A., Coates, D., Tsai, W., Nanclares, C., Cuccu, F., Yue, J. S., Brown, T. G., Mansky, R. H., Jiang, K., Kim, H., Nichols-Meade, T., Larson, S. N., Gundry, K., Zhang, Y., Tomas-Zapico, C., Lucas, J. J., Benneyworth, M., ... Gomez-Pastor, R. (2022). CK2 alpha prime and alpha-synuclein pathogenic functional interaction mediates synaptic dysregulation in huntington's disease.

- Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), 83.
<https://doi.org/10.1186/S40478-022-01379-8>
- Zakharia, K., Miyabe, K., Wang, Y., Wu, D., Moser, C. D., Borad, M. J., & Roberts, L. R. (2019). Preclinical In Vitro and In Vivo Evidence of an Antitumor Effect of CX-4945, a Casein Kinase II Inhibitor, in Cholangiocarcinoma. *Translational Oncology*, 12(1), 143. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2018.09.005>
- Zanin, S., Borgo, C., Girardi, C., O'Brien, S. E., Miyata, Y., Pinna, L. A., Donella-Deana, A., & Ruzzene, M. (2012). Effects of the CK2 inhibitors CX-4945 and CX-5011 on drug-resistant cells. *PloS one*, 7(11), e49193.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0049193>
- Zeigerer, A., Sekar, R., Kleinert, M., Nason, S., Habegger, K. M., & Müller, T. D. (2021). Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease. *Comprehensive Physiology*, 11(2), 1759–1783. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C200013>
- Zheng, Y., Mcfarland, B. C., Drygin, D., Yu, H., Bellis, S. L., Kim, H., Bredel, M., & Benveniste, E. N. (o. J.). Targeting Protein Kinase CK2 Suppresses Prosurvival Signaling Pathways and Growth of Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(23), 6484–6494. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0265>
- Zhu, Y., Liu, Q., Zhou, Z., & Ikeda, Y. (2017). PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: Critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/S13287-017-0694-Z/FIGURES/1>
- Zmazek, J., Grubelnik, V., Markovič, R., & Marhl, M. (2021). Role of cAMP in Double Switch of Glucagon Secretion. *Cells*, 10(4), 896.
<https://doi.org/10.3390/CELLS10040896>

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst Frau Prof. Dr. Claudia Götz für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und ihre fachliche Expertise danken. Ihre wertvollen Einsichten und ihr Engagement haben mir stets geholfen, Herausforderungen zu überwinden und neue Perspektiven zu gewinnen. Ihre Anleitung und fachliche Unterstützung haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich meine Forschung erfolgreich abschließen konnte. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M.D. Menger für die Kooperationsmöglichkeit zwischen der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie sowie dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanken, ebenso wie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. M. Montenarh, sowie Herrn PD Dr. Emmanuel Ampofo für die jahrelange Betreuung. Ihre Unterstützung und Ihr Rat waren für mich von unschätzbarem Wert und haben meine Forschung entscheidend geprägt. Vielen Dank für Ihre Zeit, Geduld und Ihr Vertrauen in meine Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt der Graduiertenförderung der Universität des Saarlandes (GradUS), die mich für das letzte Forschungsjahr im Rahmen eines Stipendiums finanziell unterstützt hat.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Mitarbeiter/-innen, welche ich im Verlauf meiner Master- und Doktorarbeit kennenlernen durfte. Hierbei möchte ich zunächst Frau Caroline Bickelmann für das Erlernen sämtlicher Methoden danken. Weiterer herzlicher Dank gilt zudem Frau Dr. Selina Wrublewsky, Frau Dr. Anne Böwe, Herr Dr. Tim Gulde, Frau Dr. Beate Schmitt, Frau Dr. Lisa Nalbach, Frau Dr. Jeanette Rudzitis-Auth, Frau Sandra Hans, Frau Christina Marx und Frau Janine Becker für ihre Unterstützung und Hilfe in jeglicher Hinsicht.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie, Freunde und meinen Partner, die mich während meiner gesamten akademischen Reise bedingungslos unterstützt haben. Eure Liebe, Ermutigung und Unterstützung haben mich durch Höhen und Tiefen getragen und mich stets motiviert, mein Bestes zu geben. Besonders danken möchte ich meiner Mutter Daria Vilagos, meinem Bruder Kevin Pack und meinen Cousinen Alina Klein und Tessa Klein. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen. Vielen herzlichen Dank für alles!

11. Publikationen

11.1 Veröffentlichungen aus dieser Dissertation

Ampofo, E.*, **Pack, M.***, Wrublewsky, S.*, Boewe, A. S., Spigelman, A. F., Koch, H., MacDonald, P. E., Laschke, M. W., Montenarh, M., & Götz, C. (2024). CK2 activity is crucial for proper glucagon expression. *Diabetologia* 2024 67(7), 1368–1385. <https://doi.org/10.1007/S00125-024-06128-1>

*Geteilte Erstautorenschaft

Pack, M., Götz, C., Wrublewsky, S., Montenarh, M., (2021). SGC-CK2-1 Is an Efficient Inducer of Insulin Production and Secretion in Pancreatic β -Cells. *Pharmaceutics*. 2021 22;14(1):19. doi: 10.3390/pharmaceutics14010019.

11.2 Weitere Veröffentlichungen

Nalbach, L., Roma, L. P., Schmitt, B. M., Becker, V., Körbel, C., Wrublewsky, S., **Pack, M.**, Später, T., Metzger, W., Menger, M. M., Frueh, F. S., Götz, C., Lin, H., Manning Fox, J. E., MacDonald, P. E., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Ampofo, E. (2021). Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO molecular medicine*, 13(1), e12616. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012616>

Pack, M., Gulde, T. N., Völcker, M. V., Boewe, A. S., Wrublewsky, S., Ampofo, E., Montenarh, M., & Götz, C. (2022). Protein Kinase CK2 Contributes to Glucose Homeostasis by Targeting Fructose-1,6-Bisphosphatase 1. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 428. <https://doi.org/10.3390/ijms24010428>

Wrublewsky, S.*, Glas, J.*, Carlein, C., Nalbach, L., Hoffmann, M. D. A., **Pack, M.**, Vilas-Boas, E. A., Ribot, N., Kappl, R., Menger, M. D., Laschke, M. W., Ampofo, E., & Roma, L. P. (2022). The loss of pancreatic islet NADPH oxidase (NOX)2 improves islet transplantation. *Redox biology*, 55, 102419. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102419>

*Geteilte Erstautorenschaft

Wrublewsky, S., Speer, T., Nalbach, L., Boewe, A. S., **Pack, M.**, Alansary, D., Roma, L. P., Hoffmann, M. D. A., Schmitt, B. M., Weinzierl, A., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Ampofo, E. (2022). Targeting Pancreatic Islet NLRP3 Improves Islet Graft Revascularization. *Diabetes*, 71(8), 1706–1720. <https://doi.org/10.2337/db21-0851>

12. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.