

**Neue molekulare Regulatoren für die Differenzierung  
und den Funktionserhalt des endokrinen Pankreas**

Dissertation  
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität  
zu München

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

vorgelegt von  
Petra Dames  
aus Potsdam

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2006 bis September 2010 unter der Leitung von Dr. Andreas Lechner und Prof. Dr. Burkhard Göke (Medizinische Klinik II, Klinikum der LMU) an der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München/Großhadern angefertigt und von Seiten der biologischen Fakultät der LMU von Prof. Dr. Angelika Böttger (Zellbiologie, LMU) betreut.

Erstgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Dissertation eingereicht am: November 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2012

# Inhaltsverzeichnis

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
deutsch	IX
englisch	XI
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Bedeutung des Diabetes mellitus	1
1.2 Das Pankreas	3
1.2.1 Die Embryonalentwicklung des Pankreas	4
1.2.2 Der paired-box-Homöodomänen Transkriptionsfaktor Pax6	5
1.2.3 Die $\beta$ -Zelle	7
1.2.3.1 Insulinsekretion	7
<i>Die glukosestimulierte Insulinsekretion</i>	7
<i>Die inkretinvermittelte Insulinsekretion</i>	9
1.2.3.2 Insulinwirkung in den peripheren Geweben	10
1.3 Bedeutung der Pankreasinsel sowie der $\beta$ -Zelle für die Diabestesentstehung	11
1.3.1 Typ 1-Diabetes mellitus	11
1.3.2 Typ 2-Diabetes mellitus	13
1.4 Adaptation der $\beta$ -Zelle an den metabolischen Bedarf - Modell der murinen Schwangerschaft	15
1.5 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material und Geräte	19
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2 Geräte	20
2.1.3 Software	21
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien	21
2.2.1 Laborchemikalien	21
2.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren	23
2.2.3 Enzyme	24
2.2.4 Antikörper und Seren	25
2.2.4.1 Primäre Antikörper und Seren	25
2.2.4.2 Sekundäre Antikörper und Kernfarbstoffe	25

---

2.2.5	Verwendete Kits	26
2.2.6	Häufig verwendeter Puffer	27
2.3	Biologische Materialien	27
2.3.1	Oligonukleotide	27
2.3.1.1	Primer	27
2.3.1.2	siRNAs	31
2.3.2	Expressionsvektoren und Plasmide	31
2.3.2.1	Erworbene Plasmide	31
2.3.2.2	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide	33
2.3.3	Bakterienstamm	35
2.3.4	Zelllinie	35
2.3.5	Tierstämme	35
2.4	Molekularbiologische Methoden	36
2.4.1	Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels PCR	36
2.4.1.1	Klonierungs-PCR	36
2.4.1.2	Kolonie PCR	37
2.4.1.3	Reverse Transkriptase (rt)PCR und semiquantitative rt PCR	37
2.4.1.4	Mutagenese-PCR	38
2.4.2	Restriktionsverdau	38
2.4.3	Agerosegel-Elektrophorese und Aufreinigung von DNA- Fragmenten aus Agerosegelen	38
2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.4.5	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	39
2.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.4.7	Transformation kompetenter Bakterien	40
2.4.8	Präparative Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.4.9	Sequenzierung	41
2.4.10	Glycerolstocks	41
2.4.11	RNA-Isolation	41
2.4.12	Reverse Transkriptase Reaktion	41
2.5	Zellkulturelle Methoden	42
2.5.1	Kultivierung prokaryontischer Zellen	42
2.5.2	Kultivierung eukaryontischer Zellen	42
2.5.2.1	Bestimmung der Zellzahl	43
2.5.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von INS-1E-Zellen	43
2.5.3	Transfektion von INS-1E-Zellen	

---

2.5.3.1	Transiente Plasmid-DNA Transfektion an INS-1E-Zellen	43
2.5.3.2	Generierung stabil mit Plasmid-DNA transfizierter INS-1E-Zellklone	44
2.5.3.3	Transiente siRNA-Transfektion an INS-1E-Zellen	45
2.6	Proteinchemische Methoden	
2.6.1	Gewinnung von INS-1E-Zelllysaten	45
2.6.2	Bestimmung des Proteingehalts in Zelllysaten	46
2.6.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.6.4	Western Blot	47
2.6.5	Immundetektion und „Stripping“ der PVDF-Membran	47
2.7	Zellbiologische Methoden	49
2.7.1	Insulinsekretions-Assay und Bestimmung des Gesamt- Insulingehalts	49
2.7.2	Bestimmung des Glukosemetabolismus mittels MTT-Assay	50
2.7.3	Bestimmung der Proliferation / Vitalität mittels MTT-Test	51
2.7.4	Bestimmung des sich formierten cAMP mittels cAMP-Assay	51
2.7.5	Bestimmung des intrazellulären Kalziums	51
2.8	Tierexperimentelles Arbeiten	52
2.8.1	Isolation Langerhansscher Inseln	52
2.8.2	Präparation muriner embryonaler Pankreata am Schwangerschaftstag E 18,5	53
2.8.3	Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)	54
2.8.4	Bestimmung der Blutglukose Konzentration	54
2.8.5	Bestimmung des Plasma-Insulins	54
2.8.6	Bestimmung der $\alpha$ - und $\beta$ -Zellmasse	55
2.9	Immunfluoreszenzmikroskopie	55
2.9.1	Immunfluoreszenzmarkierungen an Gewebsschnitten	55
2.9.2	Immunfluoreszenzmarkierungen an Zellkulturen	56
2.10	Statistische Analyse	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Rolle der verschiedenen Pax6 Domänen für die Differenzierung des endokrinen Pankreas	57
3.1.1	Einfluss der Paired-Domäne sowie der Transaktivierungs- domäne von Pax6 auf die Ausbildung endokriner Zellen	58
3.1.2	Einfluss der Homöodomäne von Pax6 auf die Ausbildung	

---

endokriner Zellen	60
3.1.2.1 Einfluss der Homöodomänen-Mutation Pax6 <sup>14Neu</sup> auf die Glukosetoleranz	63
3.1.3 Einfluss der beiden DNA-bindenden Domänen von Pax6 auf die Differenzierung pankreatischer $\epsilon$ -Zellen	65
3.1.4 Einfluss der Paired-Domäne von Pax6 auf die Expression anderer $\alpha$ -zellspezifischen Gene	67
3.1.5 Einfluss der Paired-Domäne von Pax6 auf die zelluläre Lokalisation des Pax6-Proteins	68
3.2 Neue molekulare Regulatoren von $\beta$ -Zellproliferation / -apoptose und -funktion	70
3.2.1 Identifizierung neuer Kandidatengene	71
3.2.1.1 Nachweis der Expression der Kandidatengene in Langerhansschen Inseln von <i>mus musculus</i> C57BL/6 und in INS-1E-Insulinomzellen	71
3.2.2 Untersuchung der Funktion der Kandidatengene in INS-1E- Insulinomzellen durch Überexpression	73
3.2.2.1 Herstellung von Expressionsvektoren und Optimierungsversuche zur Überexpression der Kandidatengene in INS-1E-Insulinomzellen	74
3.2.2.2 Einfluss der transienten Überexpression der Kandidatengene auf die Proliferation / Vitalität von INS-1E-Insulinomzellen	76
3.2.2.3 Einfluss der <u>transienten</u> Überexpression der Kandidatengene auf die glukoseabhängige Insulinsekretion von INS-1E-Insulinomzellen	77
3.2.2.4 Einfluss <u>stabiler</u> Überexpression der Kandidatengene auf die glukoseabhängige Insulinsekretion von INS-1E Insulinomzellen	78
3.2.2.5 Herstellung induzierbarer stabil überexprimierender INS-1E – Klone	80
3.2.3 Analyse der Funktion eines ausgesuchten Kandidatengens durch siRNA vermittelte Suppression der Expression in INS-1E-Zellen	80
3.2.3.1 Suppression der Expression von Eny2 in INS-1E-Zellen nach Transfektion mit siRNA's	81
3.2.3.2 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die glukosestimulierte Insulinsekretion von	

---

INS1-E-Zellen	82
3.2.3.3 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die inkretinabhängige Insulinsekretion von INS1-E-Zellen	84
3.2.3.4 Wirkungen der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Vitalität von INS-1E-Zellen	85
3.2.3.5 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Insulingehalt von INS-1E-Zellen	85
3.2.3.6 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die intrazelluläre Kalzium-Konzentration	86
3.2.3.7 Einfluss extrazellulären Kalziums auf die gesteigerte glukose- und inkretinabhängige Insulinsekretion nach siRNA vermittelter Suppression von Eny2	89
3.2.3.8 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Morphologie und das Zytoskelett von INS-1E-Zellen	91
3.2.3.9 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Glukose- Metabolismus von INS-1E-Zellen	95
3.2.3.10 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Expression zentraler Gene der Insulinsekretion	97
3.2.3.11 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Triggering- und Metabolic Amplifying Pathway	98
3.2.3.12 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf zentrale Elemente der inkretinvermittelten Signaltransduktion	101
3.2.3.13 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die 1. und 2. Phase der Insulinsekretion	107
4 Diskussion	108
4.1 Pax6 als molekularer Regulator der Differenzierung des endokrinen Pankreas	108
4.1.1 Die Transaktivierungsdomäne von Pax6 ist bedeutend für die finale Zahl pankreatischer $\alpha$ - und $\beta$ -Zellen, jedoch nicht für den finalen $\alpha$ -Zellphänotyp	109
4.1.2 Die Homöodomäne von Pax6 moduliert die finale Zahl	

---

pankreatischer $\alpha$ - und $\beta$ -Zellen	110
4.1.3 Die Paired-Domäne von Pax6 ist im Gegensatz zur HD und TA essentiell für die Ausprägung endokriner Pankreas-Zellen	111
4.1.4 Die PD von Pax6 ist essentiell für den finalen $\alpha$ -Zellphänotyp	114
4.1.5 Ein intaktes Pax6-Protein ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Inselfunktion	116
4.1.6. Zusammenfassung und Ausblick	117
4.2 Molekulare Regulatoren für den Funktionserhalt des endokrinen Pankreas	118
4.2.1 Funktionelle Analyse der Kandidatengene durch Modifikation des Expressionsniveaus	119
4.2.2 Die siRNA-vermittelte Suppression von Eny2 führt zu einer Verbesserung der glukoseinduzierten sowie inkretinvermittelten Insulinsekretion in INS-1E-Zellen	120
4.2.2.1 Ein gesteigerter Glukosemetabolismus begründet nur teilweise die gesteigerte glukosestimulierte Insulinsekretion nach Eny2-Suppression	121
4.2.2.2 Ein gesteigerter PKA-Signalweg erklärt zumindest zum Teil die gesteigerte inkretinvermittelte Insulinsekretion nach Eny2-Knockdown	124
4.2.3 Die siRNA-vermittelte Suppression von Eny2 führt zu morphologischen Veränderungen der INS-1E-Zellen	126
4.2.4 Modell der INS-1E-Zelllinie	127
4.2.5 Ausblick	129
5 Literatur	131
6 Anhang	152
Publikationen	152
Lebenslauf	154
Danksagung	155
Erklärung	156

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
CommD7	Comm-Domain containing Protein 7
DZ	Diazoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Eny2	Enhancer of yellow homolog 2
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et al.	et altera
FCS	Fötales Kälberserum
Fura-2-AM	Fura-2-Acetomethylester
g	Gramm
G418	Geneticindisulfat
GAPDH	Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GTT	Glukosetoleranztest
h	Stunde
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
INF	Interferon
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IS	Insulinsekretion
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid

---

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
KRBH	Krebs-Ringer-Bicarbonat-HEPES
MCS	Multi cloning site
Min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl- tetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaktion
pg	Picogramm
rtPCR	Reverse Transkriptase PCR
Rik	RIKEN
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
siRNA	Small interfering RNA
t	Zeit
TBM	Tolbutamid
Tcf25	Transkriptionsfaktor 25
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
tTA	Tetracycline-responsive transcriptional activator
TRE	Tet responsive element
vs.	Versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ M	Mikromolar
z.B.	Zum Beispiel

## Zusammenfassung

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist heute angesichts seiner global zunehmenden Inzidenzrate eine der häufigsten endokrinen Stoffwechselerkrankungen des Menschen. Neben der oft als Primärdefekt auftretenden Insulinresistenz peripherer Gewebe ist diese Krankheit vor allem auf funktionelle Störungen des endokrinen Pankreas und insbesondere auf ein Sekretionsversagen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen zurückzuführen. Therapiefortschritte bei dieser Erkrankung beruhen nicht zuletzt auf der Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, neue molekulare Regulatoren zu analysieren, um unser Verständnis der Differenzierung pankreatischer Inseln und des Funktionserhaltes adulter  $\beta$ -Zellen verbessern.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle dem Transkriptionsfaktor Pax6, insbesondere seinen beiden DNA-Bindedomänen, der Paired-Domäne (PD) und der Homöodomäne (HD) sowie der Transaktivierungsdomäne (TA), bei der Differenzierung endokriner Pankreaszellen zukommt. Mittels eines Vergleiches von vier verschiedenen Mauslinien, die spezifisch in einer dieser Domänen eine Mutation besaßen, konnte gezeigt werden, dass vor allem die PD von Pax6 essentiell für die Ausdifferenzierung der glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen ist. Eine Inaktivierung dieser Domäne führt zu einem schwerwiegenden, dem Pax6-Knockout (Pax6<sup>-/-</sup>) ähnlichem Pankreasphänotyp, der durch ein Fehlen der glukagonpositiven  $\alpha$ -Zellen und auch durch eine merkliche Reduzierung insulinproduzierender  $\beta$ -Zellen sowie durch eine gestörte Inselstruktur geprägt ist. Hingegen sind die HD und auch die TA für den finalen  $\alpha$ -Zelltyp von geringerer Bedeutung. Mutationen dieser Domänen führen entweder zu einem morphologisch unauffälligen Pankreasphänotyp oder zu einem Pankreasphänotyp mit verminderter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellzahl. Über die Durchführung intraperitonealer Glukosetoleranztests konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor Pax6 auch für eine normale physiologische Funktion des endokrinen Pankreas bei adulten Tieren von großer Bedeutung ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung neuer Gene bzw. Proteine, welche eine Regulatorrolle in der  $\beta$ -Zellfunktion einnehmen. Hier konnte insbesondere für das bisher ausschließlich an Hefen und Insektenzellen beschriebene, überwiegend nukleäre Protein Eny2 gezeigt werden, dass dieses in die regulatorischen Zellabläufe insulinproduzierender Vertebratenzellen involviert ist. Eine siRNA-vermittelte Suppression von Eny2 bewirkte eine deutlich gesteigerte glukosestimulierte und auch inkretininduzierte Insulinsekretion. Weiterführende Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Verstärkung der sekretorischen Antwort zumindest teilweise auf einen erhöhten Glukosemetabolismus und eine verstärkt ablaufende PKA-Signaltransduktion

zurückzuführen ist und mit einer merklichen Konzentrationszunahme des intrazellulären Kalziums einhergeht. Diese Befunde zeigen, dass Eny2 zumindest *in vitro* als negativer Regulator der glukosestimulierten, als auch der inkretinvermittelten Insulinsekretion fungiert. Noch ist allerdings unklar, auf welche Weise die bislang nachgewiesenen, vorwiegend nukleären Funktionen des Eny2 Proteins mit den hier beschriebenen Effekten verknüpft sind. Da die Effekte des Eny2-Knockdowns glukoseabhängig und additiv zum Inkretin-Signal sind, ist dieses Modell sehr attraktiv, um neue Erkenntnisse über die Insulinsekretion von  $\beta$ -Zellen zu gewinnen und um neue Ansatzpunkte für die medizinische Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus zu finden.

## Abstract

Considering the globally increasing rate of incidence, Type 2 diabetes mellitus belongs to the most frequent endocrine metabolic disorders today. In addition to insulin resistance of peripheral tissues, this disease is the result of dysfunction of the endocrine pancreas and in particular of the functional failure of  $\beta$ -cells. The progress of therapeutical strategies is based on the research of the underlying mechanisms. The aim of the present dissertation was the analysis of new molecular regulators which might improve our understanding of the differentiation of pancreatic islets and the functional maintenance of adult  $\beta$ -cells.

The first part of this work concerned the role of the transcription factor Pax6 and especially the role of its transactivation domain (TA) and of its two DNA binding domains, the paired domain (PD) and the homeodomain (HD), in differentiation of pancreatic endocrine cells. By analyzing four different mouse lines with specific mutations in one of these three domains, we found that the PD of Pax6 is essential for differentiation of glucagon producing  $\alpha$ -cells. Inactivation of this domain resulted in a phenotype similar to that of Pax6 knockout mice (Pax6<sup>-/-</sup>) with a near complete absence of glucagon positive  $\alpha$ -cells, a markedly reduced number of insulin producing  $\beta$ -cells, and a disorganized islet structure. Mutations of HD or TA showed a less severe pancreatic phenotype. Islets either exhibited no morphological changes or they showed a reduction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. Intraperitoneal glucose tolerance tests demonstrated the utmost importance of the transcription factor Pax6 for maintenance of normal pancreatic endocrine function in adult animals.

In the second part of this study we identified new genes and proteins, respectively, which could play a regulatory role in normal function of  $\beta$ -cells. In particular it was possible to show that Eny2, hitherto a protein only described in yeast or invertebrates like drosophila, is involved in the regulation of insulin secreting vertebrate cells. si-RNA mediated knockdown of Eny2 resulted in markedly increased glucose and incretin-induced insulin secretion. This could be at least in part attributed to a higher glucose-dependent cellular metabolism and an enhanced signal transduction via protein kinase A and is accompanied by elevated levels of intracellular calcium. Taken together, these results indicate that Eny2 functions as a negative regulator of glucose-stimulated and incretin-mediated insulin secretion, at least *in vitro*. However, a gap of knowledge still remains between the established nuclear functions of Eny2 and the cellular phenotype we observed upon its suppression. Nevertheless, the effects of an Eny2-knockdown are glucose dependent and additive to the incretin signaling. This feature makes this model attractive to obtain new insights in how insulin secretion of  $\beta$ -cells proceeds and how to find new therapeutical strategies to treat type 2 diabetes mellitus.

# 1 Einleitung

Um eine weitgehende Konstanz der Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten zu gewährleisten, muss der Intermediärstoffwechsel eines Organismus rasch und flexibel auf Änderungen, wie zum Beispiel Nahrungszufuhr und Nahrungskarenz, reagieren können. Für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase wird dies durch das koordinierte Zusammenspiel von vor allem Insulin und Glukagon, beides Hormone des endokrinen Pankreas, erreicht. Unter der Wirkung von Insulin werden zum einem die Zellen zur Glukoseaufnahme stimuliert, zum anderen wird ein Substratüberschuss in Form von Glykogen aber auch als Triacylglycerole in entsprechenden, als Energiedepots fungierenden Geweben, wie Leber, Fett und Muskulatur gespeichert. Sinkt der Glukosespiegel der extrazellulären Flüssigkeit, kommt es einerseits zur Hemmung der Insulinfreisetzung und andererseits kommen der Hauptgegenspieler des Insulins, das Glukagon, aber auch andere Hormone, wie die Katecholamine und Glukokortikoide, zum Tragen. Diese Insulin-antagonistischen Hormone bewirken sowohl die Glykogenolyse als auch die Glukoneogenese, Prozesse bei denen Glukose wieder gebildet wird. Ziel des Zusammenspiels von Insulin und dessen Antagonisten, wie dem Glukagon, ist die Aufrechterhaltung physiologischer Blutzuckerwerte, um die Versorgung obligat auf Glukose angewiesener Gewebe, wie des Zentralnervensystems, zu gewährleisten. Kommt es zu einer Störung des Verhältnisses dieser Hormone, führt dies unweigerlich zu einem gestörten Kohlenhydratstoffwechsel und demzufolge zu schweren Erkrankungen. Neben Hypoglykämie-Syndromen ist hierbei vor allem der Diabetes mellitus von herausragender klinischer Bedeutung.

## 1.1 Klinische Bedeutung des Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus vereint eine heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen, deren gemeinsames Charakteristikum die Hyperglykämie ist. Die Ursachen, die dieser Hyperglykämie zugrunde liegen, sind jedoch je nach Diabetestyp unterschiedlich und lassen sich im Wesentlichen auf eine Insulinresistenz, worunter man den Wirkverlust von Insulin an seinen Zielzellen versteht, einen Insulinmangel oder einer Kombination aus beidem zurückführen.

Der Mangel der Insulinwirkung bedingt, dass mit der Nahrung zugeführte Glukose nur in vermindertem Umfang von der Leber aufgenommen werden kann. Ebenso ist die Aufnahme und Verstoffwechslung in den peripheren Geweben, vor allem in der Muskulatur, stark verlangsamt, wohingegen die hepatogene Glykogenolyse und die Glukoneogenese, bewirkt durch die kontrainsulinären Hormone, verstärkt ablaufen. Diese Mechanismen führen dazu,

dass die physiologischen Glukosewerte (55-100 mg/dl beim Mensch im venösen Vollblut) nicht mehr eingehalten werden können. Wird bei mehrmaliger Bestimmung der Glukose im Blutplasma nüchtern ein Wert von 126 mg/dl oder postprandial ein Wert von 200 mg/dl überschritten, gilt ein Diabetes mellitus als manifest.

Glukose steht den Zellen insulinabhängiger Gewebe ohne hinreichende Insulinwirkung nicht mehr als energielieferndes Substrat, für die Aufrechterhaltung der zellulären Funktion, zur Verfügung. Intrazellulär zeigt sich der Diabetes mellitus damit als ein Glukosemangelzustand, wohingegen es extrazellulär zu einem Glukoseüberschuss kommt. Dieser Glukoseüberschuss wird lediglich zu einem geringen Teil, wie über die Glukosurie, direkt beseitigt. Ein weit größerer Teil wird jedoch abgelagert oder es kommt zur Aktivierung anderer Stoffwechselwege, über die Glukose umgesetzt wird. Die Folge sind pathologische nichtenzymatische Glykosylierungen von sowohl Proteinen als auch anderen Stoffen, die als so genannte AGEs (*advanced glycation end products*) bezeichnet werden (Shimoike et al., 2000), weiterhin ein gesteigerter Polyolstoffwechsel (Cameron and Cotter, 1992) sowie eine gesteigerte Glukose-Umsetzung durch den Hexosaminweg (Veerababu et al., 2000), als auch, bedingt durch die glukoseinduzierte Diacylglycerinsynthese, eine Aktivierung der PKC (Proteinkinase C; Inoguchi et al., 2000; Sheetz and King, 2002).

Diese hyperglykämisch verursachten Pathomechanismen führen zu Schädigungen vor allem im Bereich der kleinen Gefäße und stehen daher im Zentrum der Auffassung über die Entstehung der diabetesassoziierten Erkrankungen (Picchi et al., 2010). Die Mehrzahl der diabetischen Spät komplikationen, wie Neuro-, Nephro- oder Retinopathien, ist auf solche Mikroangiopathien zurückzuführen. Aber auch Makroangiopathien, deren Folge koronare, zerebrale und auch periphere arterielle Verschlusskrankheiten, bis hin zum finalen Versagen entsprechender Organe sind, werden durch eine diabetische Stoffwechsellage begünstigt.

Um den diabetischen Patienten vor den Sekundär komplikationen seiner Krankheit zu schützen, ist daher die Einstellung einer euglykämischen Stoffwechsellage durch geeignete Therapien und Medikamente unerlässlich.

Der Diabetes mellitus wird heute in vier Hauptgruppen unterteilt, die ihrerseits in Unterformen auftreten können. Ein Anteil von 5-10 % der Patienten haben Diabetes mellitus Typ 1 (Daneman, 2006). Es handelt sich dabei um eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen im Kindes- und Jungendalter, die multifaktoriell- und autoimmunvermittelt zur spezifischen Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas führt. Mit einem Anteil von 90 % ist der Diabetes mellitus Typ 2 die weit häufigste Diabetesform (Gerich, 2003). Diese Krankheit entsteht infolge des Unvermögens der  $\beta$ -Zelle ausreichend Insulin zu produzieren, um dem Bedarf des Organismus gerecht zu werden, wobei der erhöhte Bedarf meist aus einer mangelnden Insulinwirkung an den Zielzellen resultiert.

Die Ursachen der Gruppe, die als andere spezifische Diabetes-Typen bezeichnet wird, sind sehr unterschiedlich. Sie reichen von genetisch bedingten Störungen der Insulinsekretion oder der  $\beta$ -Zelle über Endokrinopathien und Pankreasdefekten bis hin zu Infektionen oder gehen auf verschiedene Medikamente zurück.

Bei der Gruppe des Gestationsdiabetes handelt es sich um eine erstmals während der Schwangerschaft diagnostizierte Glukose-Intoleranz, die sich häufig nach der Geburt wieder normalisiert, aber auch schon auf einen sich entwickelnden Diabetes mellitus Typ 2 hindeuten kann (Kim et al., 2002).

## 1.2 Das Pankreas

Das Pankreas spielt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der ernährungsbedingten Homöostase, da es sowohl exokrine als auch endokrine Drüsenanteile vereint, wobei das endokrine Pankreas an der Entstehung aller Diabetesformen beteiligt ist.

Das exokrine Pankreas setzt sich aus den Azinuszellen und dem dazu gehörigem Gangsystem zusammen. Es ist verantwortlich für die Produktion und Sekretion einer Reihe von Verdauungsenzymen, wie der  $\alpha$ -Amylase, Lipasen, RNasen, DNasen, bzw. deren Vorstufen, wie Trypsinogen und Chymotrypsinogen. Zudem findet im exokrinen Pankreas die Bildung von Bikarbonat statt, welches eine tragende Rolle bei der Säure-Base-Balance des Verdauungstraktes spielt.

Cirka 2 % der Zellen des Pankreas sind jedoch im Inselorgan, den so genannten Langerhansschen Inseln, kompartimentiert. Diese stellen die funktionelle Einheit des endokrinen Pankreas dar. Verteilt sind die Langerhansschen Inseln über das gesamte Pankreas, wobei der Hauptanteil beim Menschen im Körper und im Schwanz dieses Organs zu finden ist.

In einer Langerhansschen Insel sind fünf verschiedene Arten endokriner Zellen clusterartig organisiert. Das sind mit einem Anteil, der je nach Spezies rund 50-80 % betragen kann (Brissova et al., 2005; Kulkarni, 2004), die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen, mit einem Anteil von 15-20 % die  $\alpha$ -Zellen, welche Glukagon bilden, die somatostatinbildenden  $\delta$ -Zellen, die 5-10 % des Inselzellanteils ausmachen sowie die PP- und die erst zu Beginn des 21. Jahrhunderts identifizierten  $\epsilon$ -Zellen (Prado et al., 2004; Wierup et al., 2002; Wierup et al., 2004), welche für die Sezernierung des pankreatischen Polypeptids, bzw. des Ghrelins verantwortlich sind. Insulin und Glukagon spielen, wie oben aufgeführt, antagonistische Rollen in der Regulation des Glukoselevels. Somatostatin hingegen hat eine parakrine, inhibitorische Wirkung auf die benachbarten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen, wohingegen das pankreatische Polypeptid hemmend auf die Sekretion des exokrinen Pankreas und des Magensaftes wirkt.

Über die Funktion des in den pankreatischen  $\epsilon$ -Zellen produzierten Ghrelins ist man sich noch nicht schlüssig (Heller et al., 2005; Wierup et al., 2002).

### 1.2.1 Die Embryonalentwicklung des Pankreas

Während der Embryogenese kommt es am Tag 8,5-9,0 (E 8,5-9,0), bei einer sich entwickelnden Maus, zu dorsalen und ventralen Ausstülpungen des sich aus dem Entoderm bildenden Duodenums. Diese Auswüchse wachsen, verzweigen und differenzieren sich, fusionieren miteinander und bilden schließlich das Pankreas mit seinen exo- und endokrinen Anteilen (Edlund, 2002).

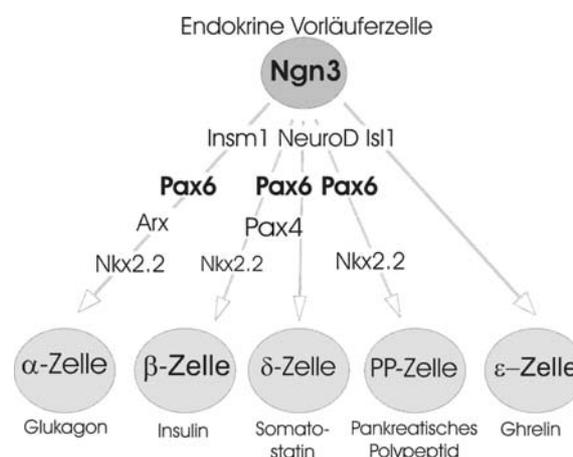
Die ersten endokrinen Zellen die erscheinen (E 9,5), sind unreife  $\alpha$ -Zellen. Eine Subpopulation dieser glukagonpositiven Zellen exprimiert gleichzeitig auch Insulin (Teitelman et al., 1993). Interessanter Weise stellen diese ko-exprimierenden Zellen weder Vorläuferzellen von ausdifferenzierten  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Zellen dar (Herrera, 2000). In signifikanter Zahl treten die ersten Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen ab E 13,5 (Herrera et al., 1991) auf, während die ersten Somatostatin-bildenden  $\delta$ -Zellen ab E 15 anzutreffen sind. Die PP-Zellen sind schließlich die letzten der klassischen Inselzellen, die erscheinen (Pictet et al., 1972). Diese differenzieren sich erst ab E 18, also kurz vor der Geburt.

Die Entwicklung des Pankreas unterliegt dabei der strengen Kontrolle einer kaskadenartigen Expression von Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor, durch den die Pankreasorganogenese initiiert wird, ist der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox*). Wie durch Knockouttiere (*Pdx1<sup>-/-</sup>*) nachgewiesen wurde, führt ein Fehlen dieses Faktors dazu, dass kein Pankreas angelegt wird (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Bei einem sich normal entwickelnden Mausembryo ist *Pdx1* zwischen dem Tag E 8,5 und E 9 nachweisbar, während sich erste pankreatische Ausstülpungen des Duodenums erst ab E 9,0-E 9,5 histologisch belegen lassen (Edlund, 2002). Ab dem Tag E 15,5 wird *Pdx1* dann ausschließlich in den  $\beta$ -Zellen und einigen wenigen  $\delta$ -Zellen exprimiert (Edlund, 2001; McKinnon and Docherty, 2001). Ein anderer Transkriptionsfaktor, der ebenfalls für die frühe Pankreasentwicklung wichtig ist, ist der *basic Helix Loop Helix*- (bHLH) Transkriptionsfaktor *Ptf1a* (*pancreas specific transcription factor 1a*). Anfänglich für die Entwicklung aller Pankreaszellen, bzw. für deren räumliche Anordnung verantwortlich, erstreckt sich seine Expression ab E 13,5 nur noch auf Vorläuferzellen der Azini (Krapp et al., 1998).

Bedeutsam für die Einleitung der Bildung der endokrinen Vorläuferzellen ist der bHLH-Transkriptionsfaktor *Ngn3* (*neurogenin 3*) (Collombat et al., 2003; Gu et al., 2002). Dieser tritt ab E 9 auf und bewirkt die Initiierung einer sequenziellen Aktivierung verschiedener weiterer Transkriptionsfaktoren, wie *Isl1*, *Insm1* (*insulinoma-associated 1*), *NeuroD1* (*neurogenic*

*differentiation*), *Arx* (*aristales-related homeobox*) (Ahlgren et al., 1997; Gierl et al., 2006; Naya et al., 1997) sowie Mitglieder der *Nkx-* (*NK-related homeobox*) und der *Pax-* (*paired box*) Familie, welche schließlich für die Zellzahl und die finale Differenzierung der einzelnen Inselzellpopulationen wichtig sind (Abb. 1.1).

Zwei Transkriptionsfaktoren, *Pax4* und *Pax6*, sind für die Ausprägung der endokrinen Zellen von besonderer Bedeutung. Ein Verlust dieser beiden Faktoren hat, wie ein Fehlen von *Ngn3*, ein Fehlen jeglicher endokriner Zellen zufolge (Gradwohl et al., 2000). *Pax4* tritt dabei nur vorübergehend in der Embryogenese auf und ist für die Differenzierung von  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen wichtig (Sosa-Pineda et al., 1997). *Pax6* hingegen ist ab E 9,5 in allen Inselzellen bzw. deren Vorstufen präsent und ist auch postnatal noch in allen Langerhanszellen, mit Ausnahme der  $\epsilon$ -Zellen, aktiv (Dohrmann et al., 2000; Heller et al., 2005; Sander et al., 1997).



**Abb. 1.1: Differenzierung endokriner Pankreasinseln und einiger der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren.** Ausgehend von einer endokrinen Vorläuferzelle wird die Bildung der einzelnen Inselzellpopulationen durch entsprechende Transkriptionsfaktoren initiiert (nach Murtaugh, 2007).

### 1.2.2 Der *paired-box*-Homöodomänen Transkriptionsfaktor Pax6

Pax6 ist ein evolutionär hoch konservierter Transkriptionsfaktor, der sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten wesentliche Funktionen während der Embryogenese, aber auch darüber hinaus, ausübt. Pax6 ist neben der Entwicklung des Pankreas (St-Onge et al., 1997) auch an der Bildung verschiedener anderer Organe, wie der Nase, des Auges (Grindley et al., 1995; Quinn et al., 1996) oder des Gehirns beteiligt (Gotz et al., 1998; Grindley et al., 1997). Wie man beispielsweise an *Sey-* (*small eye*) Mausmutanten feststellen konnte (Hill et al., 1991), führen homozygote Inaktivierungen von Pax6 zu einem vollständigen Fehlen von sowohl Auge als auch Nase. Betroffene Individuen versterben kurz nach der Geburt. Heterozygote Mutationen äußern sich beim Menschen in Aniridie, wobei die Iris in Teilen

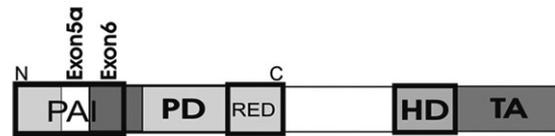
oder vollständig fehlen kann (Glaser et al. 1992). Ebenso zeigen sich Defekte in Cornea, Linse, im optischen Nerv und auch der Retina (Curto et al., 2007). Wegen der Beteiligung von Pax6 an der Entwicklung des endokrinen Pankreas sind heterozygote Mutationen dieses Transkriptionsfaktors darüber hinaus oft diabetesassoziiert (Ashery-Padan et al., 2004; Yasuda et al., 2002).

Pax6 gehört zur Familie der *paired box-* (*pax*) Proteine, deren gemeinsames Strukturmerkmal die Paired-Domäne (PD) am N-Terminus des Proteins ist (Bopp et al., 1986). Diese ihrerseits setzt sich aus zwei globulären Untereinheiten, der PAI-Subdomäne und der RED-Subdomäne, die unterschiedliche DNA-Bindungseigenschaften aufweisen, zusammen (Czerny et al., 1993; Jun and Desplan, 1996). Darüber hinaus verfügt Pax6 über eine zweite DNA-Bindedomäne. Dies ist die Homöodomäne (HD), die durch ein Glutamin- und Glycin-reiches Linkersegment mit der PD verbunden ist (Abb. 1.2). Neben der DNA-Bindung ist die HD ebenfalls in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen einzugehen. HD und PD können sich so gegenseitig bei der DNA-Bindung beeinflussen (Jun and Desplan, 1996; Mishra et al., 2002; Singh et al., 2000). Am carboxyterminalen Ende von Pax6 befindet sich eine Prolin/Serin/Threonin- (PST) reiche Region, die so genannte Transaktivierungsdomäne (TA; Tang et al., 1998; Walther and Gruss, 1991).

Für das Pax6-Gen sind verschiedene Splice-Varianten beschrieben worden (Anderson et al., 2002; Epstein et al., 1994; Mishra et al., 2002). Die meisten betreffen die PD, bei welcher es oft zu einer Integration eines zusätzlichen, 14 Aminosäuren großen Fragmentes, dem Exon 5a [Pax6(5a)], kommt (Abb.1.2). Je nach Abwesenheit oder Präsenz des Exon 5a ändern sich die Bindungseigenschaften des Pax6 Transkriptionsfaktors durch die PD. Während die kanonische, Exon 5a-freie Form, via PAI-Subdomäne an die DNA des Zielgens bindet, bedingt die Insertion des Exon 5a eine Bindung durch die RED-Subdomäne (Epstein et al., 1994). Das richtige Verhältnis dieser Splice-Varianten ist unter anderem wichtig bei der Differenzierung bestimmter Organe, wie zum Beispiel dem Auge (Dominguez et al., 2004; Singh et al., 2002).

Ebenso wie die beschriebenen Splice-Varianten der PD spielen die verschiedenen Domänen von Pax6 bei der Ausprägung unterschiedlicher Organe distinkte Rollen.

Dies scheint auch die Pankreasinseln zu betreffen. Während Pax6-Knockout-Mäuse (*Pax6*<sup>-/-</sup>) keinerlei  $\alpha$ -Zellen bilden, eine reduzierte  $\beta$ -Zellzahl und auch eine desorganisierte Inselstruktur aufweisen (St-Onge et al., 1997), ist der Phänotyp der Sey-Mutanten weit weniger ausgeprägt. Bei dieser Mutation entsteht ein trunkiertes Pax6-Protein mit Deletionen, die entweder die HD und TA oder nur die TA betreffen (*Pax6*<sup>Sey</sup>, *Pax6*<sup>Sey-Neu</sup>, Hill et al., 1991; Sander et al., 1997). Bei dieser Mutation kommt es zwar zur Differenzierung aller endokrinen Zellen, jedoch sind diese in ihrer Zellzahl reduziert.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des *paired-box*-Homöodomänen-Transkriptionsfaktors Pax6.** Das Pax6-Protein besteht aus verschiedenen Domänen. N-Terminal befindet sich die so genannte Paired-Domäne (PD), welche über ein Linkersegment mit der Homöodomäne (HD) verbunden ist. C-Terminal befindet sich die Prolin-, Serin-, Threonin-reiche Transaktivierungsdomäne (TA). Durch alternatives Spleißen kann es zur Insertion eines 14 Aminosäuren großen Segmentes, dem Exon 5a, kommen.

### 1.2.3 Die $\beta$ -Zelle

Die  $\beta$ -Zelle ist die hochspezialisierte endokrine Zelle, welche das einzige blutzuckersenkende und daher auch bedeutendste anabole Hormon des Organismus, das Insulin, bildet. Dieses 5,8 kDa große Proteohormon wird zusammen mit dem C-Petid, welches wie Insulin aus dem Proinsulin hervorgeht, auf einen Stimulus hin sezerniert.

Sowohl für die Entwicklung als auch Differenzierung der  $\beta$ -Zelle während der Embryogenese spielen, wie oben erwähnt, viele Transkriptionsfaktoren, wie NGN3, Pax4, Pax6, Pdx1 eine wichtige Rolle (Gradwohl et al., 2000; Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996; Sosa-Pineda et al., 1997). Aber auch postnatal sind viele dieser Proteine, unter ihnen Pdx1, der Insulinrezeptor (IR), die Insulinrezeptorsubstrate-1 und -2 (IRS-1, -2), für das  $\beta$ -Zellwachstum, die  $\beta$ -Zellreplikation sowie für die Aufrechterhaltung des  $\beta$ -Zell-Phänotyps unentbehrlich (Bruning et al., 1997; Melloul et al., 2002; Otani et al., 2004). Pdx1 beispielsweise ist der Hauptregulator der Insulin-Gen-Expression und interagiert ebenso mit den Promotorregionen mehrerer anderer Gene, darunter auch die IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*), der Glukosetransporter-2 (Glut-2) oder die Glukokinase (Melloul, 2004). Dieser Transkriptionsfaktor ist daher, neben anderen, ein entscheidender Regulator für die wesentlichste Funktion der  $\beta$ -Zelle, die Insulinsekretion.

#### 1.2.3.1 Insulinsekretion

##### Die glukosestimulierte Insulinsekretion

Der primäre Auslöser der Insulinsekretion ist Glukose (Matschinsky, 1996). Steigt die extrazelluläre Glukosekonzentration über einen Wert von  $\sim 5\text{mM}$  (Matschinsky and Collins, 1997), beginnt die  $\beta$ -Zelle mit einer gesteigerten Insulinsekretion. Unter physiologischen Bedingungen verläuft die Sekretion des Hormons dabei kongruent mit steigenden Blutglukosespiegeln bis zu einem Blutglukosewert von  $\sim 20\text{mM}$  und gewährleistet somit den Aufrechterhalt der Normoglykämie des Organismus.

Zwei Schlüsselkomponenten, welche die Stärke der Insulinsekretion an die extrazelluläre Glukosekonzentration koppeln, sind ein in der Membran der  $\beta$ -Zelle verankertes Glukosetransportprotein (Glut-2 bei Nagern; hLAT1 beim Menschen) und die Glukokinase. Über das Glukosetransportprotein, ein hoch- $K_m$  Glukosetransporter, wird die Hexose von den  $\beta$ -Zellen aufgenommen und durch die Glukokinase phosphoryliert. Dieses Enzym besitzt ebenfalls, wie auch das Glukosetransportprotein, eine geringe Affinität für Glukose und determiniert daher die Glykolyse- und damit auch Glukosemetabolismusrate der  $\beta$ -Zelle. Das entstandene Glukose-6-Phosphat wird über die weiteren Schritte der Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert, welches dem Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-, Citrat- oder Krebs-Zyklus) der Mitochondrien zugeführt wird. Über die Generierung verschiedener Reduktionsäquivalente, wie NADH und  $FADH_2$  (Ishihara et al., 1999), wird die Elektronentransportkette aktiviert. Dieses führt zu einer Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran und stellt damit den entscheidenden Schritt für die Bildung von ATP (Adenosintriphosphat) aus ADP (Adenosindiphosphat) auf der extramitochondrialen Seite. Die Erhöhung des zytosolischen ATP/ADP Verhältnis führt zum Verschluss plasmamembranständiger ATP-abhängiger Kalium-Kanäle ( $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanäle) (Ashcroft and Gribble, 1999; Rorsman, 1997). Diese Kanäle setzen sich sowohl aus einer porenformenden, Kir6.2, als auch einer regulatorischen Untereinheit, SUR1 (*sulphonylurea receptor*), zusammen (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Seino, 1999). Die Bindung von ADP an SUR1 bewirkt die Öffnung des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals, was unter nicht-stimulatorischen Glukosebedingungen, unter welchen das ATP/ADP-Verhältnis zu Gunsten des ADP's verschoben ist, zum Ruhemembranpotential der  $\beta$ -Zelle beiträgt. Die Bindung von ATP an Kir6.2 hingegen führt zum Verschluss des Kanals, was die Depolarisation der Zelle nach sich zieht (Gribble et al., 1998; Henquin et al., 2003). Bei Erreichen eines Schwellenpotentials kommt es zur Öffnung, ebenfalls membranständiger, spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle (L-Type VDCC, *voltage dependent calcium channels*) und damit zum Einstrom von Kalziumionen. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) stellt das Trigger-Signal für die Exozytose Insulin-haltiger Granula dar, ein Prozess, der eine Reihe weiterer Proteine, wie die SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), GTP-binding proteins sowie das Zytoskelett involviert (Kowluru, 2003; Lang, 1999; Leung et al., 2007; Li et al., 2004). Für die Repolarisation der pankreatischen  $\beta$ -Zelle spielen spannungsabhängige Kalium-Kanäle ( $K_v$ -Kanäle) eine entscheidende Rolle. Sie öffnen infolge der glukoseinduzierten Membrandepolarisation und bewirken so den Auswärtsstrom positiv geladener Kalium-Ionen.

Neben dem oben beschriebenen, so genannten Triggering Pathway, wird die glukoseinduzierte Insulinsekretion in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen noch durch einen anderen Weg kontrolliert, der ebenfalls vom Glukosemetabolismus der Zellen abhängt. Dieser, als

Metabolic Amplifying Pathway bezeichnete Verstärkungsmechanismus des Triggering-Pathways (Henquin, 2009), ist jedoch nicht direkt von den  $K^+_{ATP}$ -Kanälen abhängig und führt auch zu keiner weiteren Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie zwei unabhängige Studien belegen konnten (Gembal et al., 1992; Sato et al., 1992; Sato et al., 1999). Sie zeigten an Maus- bzw. Ratteninseln, dass trotz depolarisierender extrazellulärer KCl-Konzentration in Anwesenheit von Diazoxid, eine Substanz, welche die Öffnung der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle bewirkt, eine Steigerung der Insulinsekretion durch Erhöhung der Glukosekonzentration möglich ist.

Über mögliche Komponenten oder Effektoren, die diesen Weg der Verstärkung der Insulinsekretion induzieren, ist man sich noch uneins. Es werden unter anderem sowohl ATP, cAMP, NADPH/NADP<sup>+</sup> (Panten and Rustenbeck, 2008), Intermediärprodukte des TCA sowie die Proteinkinasen A und C (PKA, PKC), Phospholipase A<sub>2</sub>, ebenso die Insulin-Granula-Translokation durch das Zytoskelett diskutiert (Chen et al., 2008; Henquin, 2000; Rorsman and Renstrom, 2003; Sato and Henquin, 1998).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zeigt die glukosestimulierte Insulinsekretion einen typischen biphasischen Verlauf. Die erste Phase äußert sich mit einer schnellen, jedoch transienten Zunahme der Sekretionsaktivität, als Folge des schnellen Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_i$ , nach entsprechendem Glukosestimulus. Die erste Phase umfasst eine Dauer von circa 10-15 Minuten und geht schließlich in die zweite Phase über. Diese ist durch eine stabil anhaltende, teilweise oszillatorisch verlaufende und zum Teil auch wieder ansteigende Insulinsekretion gekennzeichnet (Henquin, 2009).

Ausgehend von der Hypothese über die Existenz verschiedener Pools insulinhaltiger Granula (Bratanova-Tochkova et al., 2002) ist für die schnelle Exozytose während der ersten Phase der Insulinsekretion der so genannte *releasable* Pool verantwortlich. Dieser umfasst sowohl sich in unmittelbarer Nähe zur Membran befindliche als auch bereits an die Membran gebundene, zur Sekretion bereite Exozytosevesikel, die auf einen  $Ca^{2+}$ -Stimulus hin ihren Inhalt in den Extrazellularraum entleeren (Barg et al., 2002). Während der zweiten Phase kommt es zum Transport, zur Reifung sowie zur Membranverschmelzung insulinhaltiger Granula aus dem so genannten *Reserve*-Pool. Diese letzt genannten Prozesse sind, neben Kalzium, auch abhängig von dem Energie-Status der  $\beta$ -Zelle und werden daher vermutlich eher vom Metabolic Amplifying Pathway beeinflusst (Rorsman and Renstrom, 2003).

### **Die inkretinvermittelte Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle wird nicht nur allein durch Glukose kontrolliert. Andere Faktoren, wie Fettsäuren oder Aminosäuren, tragen ebenfalls zur Potenzierung der glukoseinduzierten Insulinsekretion bei (Boden, 2005; Floyd et al., 1966; Newgard and

McGarry, 1995; Zawalich et al., 2004). Gleichermaßen unterliegt sie auch der neuronalen und hormonellen Regulation. Dies schließt, neben der parakrinen Wirkung anderer Inselhormone sowie der autokrinen Wirkung des Insulins selbst, auch die insulinotrophischen Effekte so genannter Inkretin-Hormone mit ein. Inkretine sind Hormone, die von enteroendokrinen Zellen des Darms gebildet und durch einen neuronalen Stimulus oder durch Stimulation infolge von Nahrungsaufnahme sezerniert werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei das gastroinhibitorische Peptid (GIP) sowie das GLP-1 (*Glucagon Like Peptide-1*), die beide in Synergie zur Glukose eine deutliche Steigerung der Insulinsekretion hervorrufen. Wie angedeutet, ist jedoch in jedem Fall die Anwesenheit von Glukose als primärer Auslöser der Insulinsekretion essentiell.

Das mit dem Glukagon strukturverwandte GLP-1 wird von den L-Zellen der intestinalen Mukosa gebildet. Es entsteht durch alternatives Splicing des Proglukagongens durch die Prohormonkonvertase 1 (Dhanvantari et al., 2001). GLP-1 bindet an spezifische, membranständige, heptahelikale Transmembranrezeptoren der  $\beta$ -Zelle und aktiviert so über ein gekoppeltes heterotrimeres G-Protein (Thorens et al., 1993) die Adenylatcyklase (AC; (Delmeire et al., 2003). Dies wiederum führt zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, was auf der einen Seite zur Aktivierung des PKA-Signalweges (Wang et al., 1999) und auf der anderen Seite zur Aktivierung des Epac- (*exchange proteins directly activated by cAMP*; de Rooij et al., 1998) Signalweges führt (Holz, 2004). Über diese beiden Signalwege werden dann andere Effektoren, wie die  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanäle (Holz et al., 1993; Kang et al., 2006), L-Type VDCC (Britsch et al., 1995; Ammala et al., 1993),  $K_v$ -Kanäle (Ashcroft and Rorsman, 1989; MacDonald et al., 2003), nicht-selektive Ionenkanäle (Leech and Habener, 1997), aber auch intrazelluläre Kalzium-Kanäle des ER's (Gromada et al., 1995; Holz et al., 1999; Kang et al., 2005) sowie direkt an der Exozytose insulinhaltiger Vesikel beteiligter Komponenten (Renstrom et al., 1997), in ihrer Aktivität moduliert und bewirken letztlich die Zunahme der glukoseinduzierten Insulinsekretion.

### 1.2.3.2 Insulinwirkung in den peripheren Geweben

Insulin ist, neben der Stimulation der Zellen zur Glukoseaufnahme, für eine Vielzahl anderer Signalwege verantwortlich, welche die Gewebsdifferenzierung, das Zellwachstum sowie Genexpression und Proteinsynthese beeinflussen (Desbois-Mouthon et al., 2000). Neben anderen Geweben fallen, wegen ihrer Masse und der Stoffwechselbedeutung für den Organismus, besonders die Muskulatur, das Fettgewebe und die Leber als Insulinempfindliche Gewebe ins Gewicht. Dort bindet Insulin an seinen membranintegralen Rezeptor, ein Tetramer aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit Tyrosinkinase-Aktivität. Nach Aktivierung der Tyrosinkinase und Autophosphorylierung des Insulinrezeptors kommt

es zur Rekrutierung spezifischer Proteine. Die wichtigsten dieser so genannten Adapter-Proteine sind die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und von ihnen insbesondere IRS-1 und IRS-2. Diese werden durch die Tyrosinkinase-Aktivität an verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert und stellen ihrerseits wiederum Aktivatoren für andere Proteine, wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) oder der Proteinkinase B (PKB) dar. Es kommt zur Induktion verschiedener anderer gewebsspezifischer Signaltransduktionsmechanismen, die, zumindest in den Myo- und Adipozyten, zur Translokation des Glukosetransporters-4 (Glut-4) (Huang and Czech, 2007) in die Zellmembran und damit zur Aufnahme von Glukose in diese Gewebe führen. Weiterhin kommt es zur Induktion der Genexpression von in die Glykolyse und Lipogenese involvierten Enzymen sowie zur Repression von Glukoneogenese- und Lipolyse-Enzymen. In den Hepatozyten hingegen bewirkt Insulin keine Translokation von Glukosetransportmolekülen. Sie besitzen, wie die pankreatische  $\beta$ -Zelle, konstitutiv in die Membran integrierte Glukosetransporter vom Typ 2 (Glut-2) und nehmen Glukose, innerhalb gewisser Grenzen, ebenfalls proportional zur extrazellulären Glukosekonzentration auf. Insulin bewirkt in den Leberzellen, neben anderen Effekten, vor allem, dass Enzyme der Glykogenolyse reprimiert und die der Glykogensynthese aktiviert werden (Lee and White, 2004).

Neben den angeführten Effekten zur Senkung der Blutglukose und damit zur Einstellung einer normoglykämischen Stoffwechsellage in den peripheren Geweben ist Insulin auch para- und autokrin aktiv. Durch die autokrine Wirkung des Insulins kommt es in der  $\beta$ -Zelle, ebenfalls über die Phosphorylierung von IRS-2 (Kim and Novak, 2007), zur Aktivierung einer Reihe von Signalkaskaden, die auf verschiedenen Ebenen die glukoseinduzierte Insulinsekretion, die Insulinsynthese an sich, aber auch das Wachstum der  $\beta$ -Zelle beeinflussen. Neben Anderen stellen möglicherweise diese Rückkopplungsmechanismen wichtige Angriffspunkte für pathophysiologische  $\beta$ -Zellfunktion im Zuge der Diabetesentstehung dar.

## **1.3 Bedeutung der Pankreasinsel sowie der $\beta$ -Zelle für die Diabetesentstehung**

### **1.3.1 Typ 1-Diabetes mellitus**

Diese Form des Diabetes mellitus manifestiert sich zumeist bereits im juvenilen Alter, kann jedoch, wie im Fall des *Latent Autoimmune Diabetes with onset in Adults* (LADA), auch erst im Erwachsenenalter auftreten.

Bedingt durch eine Autoimmunreaktion führt diese Erkrankung mehr oder weniger rasch, zum Teil auch über Jahre verlaufend, zu einer progredienten spezifischen Destruktion der  $\beta$ -

Zellen des endokrinen Pankreas, was wiederum einen akuten Insulinmangel und damit eine Hyperglykämie mit allen Folgeerscheinungen zur Konsequenz hat.

Die Ursachen, die dieser Krankheit zugrunde liegen, sind bisher jedoch unvollkommen verstanden. Diskutiert werden sowohl genetische, als auch Ernährungs- beziehungsweise Umgebungskomponenten.

Im Zusammenhang mit den genetischen Faktoren konnte eine Assoziation zwischen der Krankheitsanfälligkeit und den MHC-Klasse-II-Allelen HLA-DR3 und HLA-DR4 festgestellt werden (Nerup et al., 1974). Aber auch andere Genloci, die das Insulingen betreffen (Bain et al., 1992), wie beispielsweise die VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) oberhalb des Insulingens oder eine Splice-Variante des T-Zell-Funktionsregulators CTLA-4 (Ueda et al., 2003), werden mit der Krankheitsprädisposition in Verbindung gebracht. Der Genotyp allein entscheidet jedoch meist nicht, ob es zur Erkrankung kommt. Möglicherweise bedarf es hierfür eines Triggerereignisses. Hierfür stehen zum Beispiel Virusinfekte (Hyoty et al., 1988; Yoon et al., 1978; Yoon et al., 1978), die frühe Exposition gegenüber Kuhmilch oder Gluten (Ludvigsson, 2006; Wasmuth and Kolb, 2000), aber auch verschiedene Toxine in der Diskussion.

Entweder spontan oder infolge eines solchen Auslösefaktors beginnt die Erkrankung, bei vorliegender genetischer Prädisposition, mit einer Insulitis, worunter man die Infiltration der pankreatischen Inseln mit Immunzellen versteht. Wie Untersuchungen an Tiermodellen aber auch am Menschen belegen, handelt es sich bei den primär infiltrierenden Zellen vorwiegend um Makrophagen, dendritische Zellen, aber auch um T-Lymphocyten (Hanenberg et al., 1989; Imagawa et al., 2001). Lokalisiert sind sie, in dem als Peri-Insulitis bezeichnetem frühem Stadium der Erkrankung, noch überwiegend in der Peripherie der Insel (Burkart and Kolb, 1996; Dahlen et al., 1998). Durch die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder inflammatorischer Zytokine, wie verschiedene Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-10), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) oder dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bewirken die Makrophagen und T-Lymphocyten jedoch ein Voranschreiten der Inselinfiltration. In den  $\beta$ -Zellen werden entsprechende apoptoseinitiiierende Signalkaskaden, wie der Fas-Signalweg (Mandrup-Poulsen, 1996), aktiviert. Es kommt zur Rekrutierung weiterer Makrophagen, T-Lymphocyten, aber auch NK-Zellen. Schließlich führt die Insulitis mit hoher Selektivität zu einer vollständigen Destruktion der  $\beta$ -Zellen, während andere Inselzellen verschont bleiben. Begleitet wird die Erkrankung in 85-90 % der Fälle durch das Auftreten zirkulierender Autoantikörper, was die autoimmune Reaktivität dieser Krankheit wiedergibt. Diese Antikörper, die unter anderem gegen Inselzellstrukturen (ICA, *Islet Cell Antibodies*), Insulin (IAA, *Insulin-Autoantibodies*), die Glutamatdecarboxylase (GAD65, *Glutamic Acid decarboxylase*) oder gegen die Tyrosinphosphatase (IA-2, *Inulinoma-Associated tyrosine phosphatase*) gerichtet sein können, entstehen sekundär als Folge der Freisetzung von

Autoantigenen aus den Inseln und tragen nach heutigem Kenntnisstand selbst nicht zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen bei (Martin et al., 2001). Sie dienen als diagnostische Indikatoren für den Nachweis des Diabetes mellitus Typ 1. Da sie auch bereits in der prädiabetischen Phase präsent sind, erlauben sie zudem die Früherkennung der Erkrankung und ermöglichen so die Einleitung entsprechender Präventivmaßnahmen.

### 1.3.2 Typ 2-Diabetes mellitus (T2DM)

Der T2DM ist, wie die erhöhte Prävalenz innerhalb von Familien betroffener Personen oder innerhalb bestimmter Bevölkerungsgruppen zeigt, ebenfalls genetisch determiniert (Scott et al., 2007; Sladek et al., 2007; Suchindran et al., 2009), wobei die genetische Anlage jedoch nicht mit der des Typ 1-Diabetes mellitus identisch ist. Zusammen mit erworbenen Umweltfaktoren, wie Adipositas, Bewegungsarmut, Rauchen (Targher et al., 1997), aber auch ein höheres Alter, bewirkt die Erkrankung eine gravierende Störung des Kohlenhydrat- sowie des Lipidstoffwechsels.

Charakteristisch für die Pathogenese des T2DM ist eine Sekretionsinsuffizienz der  $\beta$ -Zelle in Verbindung mit einer peripheren Insulinresistenz (Kahn and Flier, 2000; Kahn, 2000). Welches die molekularen Mechanismen sind, die zu einer mangelnden Insulinwirkung an den Zielzellen führen, ist noch nicht abschließend geklärt. In vielen Fällen konnte man zeigen, dass zum Beispiel ein Postrezeptordefekt (z.B. Glut-4) in entsprechenden Zellen eng mit der Insulinresistenz korreliert, wobei dieser oft sekundär infolge gestörter Signalkaskaden (z.B. IRS Signalkaskade) auftritt (Goodyear et al., 1995; Rung et al., 2009; Virkamaki et al., 1999).

Nach aktuellen Erkenntnissen sind die Ursachen der  $\beta$ -Zelldysfunktion polygenen Ursprungs, während die Ursachen, die der Insulinresistenz zugrunde liegen, auf externe Faktoren zurückzuführen sind, wobei der Anteil der Genetik daran noch unklar ist (Ahlqvist et al., 2011; Muoio and Newgard, 2008; Rung et al., 2009). Wie die hohe Zahl übergewichtiger Menschen mit Typ 2-Diabetes mellitus zeigt, ist dieser Diabetestyp zudem häufig Adipositas-assoziiert (Maes et al., 1997). Ferner weisen viele dieser adipösen Patienten eine arterielle Hypertonie sowie eine Dyslipidämie im Rahmen des metabolischen Syndroms auf.

Der aus der Insulinresistenz resultierende Mehrbedarf an Insulin, um eine physiologische Blutglukose aufrecht zu halten, wird anfangs noch erfolgreich von der  $\beta$ -Zelle, durch Erhöhung der  $\beta$ -Zellmasse, aber auch durch Verbesserung der sekretorischen Funktion, kompensiert (Polonsky, 2000). Wird in diesem prädiabetischen Stadium nicht durch geeignete Therapien, wie Ernährungsumstellung, sportliche Aktivität oder mittels geeigneter Medikamente, interveniert, kommt es bei entsprechender genetischer Prädisposition bald zu

einer eingeschränkten  $\beta$ -Zell-Kompensationskapazität, bis hin zur  $\beta$ -Zell-Apoptose (Unger and Zhou, 2001).

Wie letztendlich die Insulinresistenz zum Versagen der  $\beta$ -Zellen führt, ist bisher jedoch unzureichend verstanden. Inflammatorische Mediatoren, wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , eine erhöhte Stresssituation des ER's (Araki et al., 2003; Donath and Halban, 2004), zum Beispiel infolge der erhöhten Insulinsynthese, das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Kajimoto and Kaneto, 2004), gleichermaßen der Verlust fundamentaler Komponenten der Sekretionsmaschinerie oder chronisch erhöhte intrazelluläre Kalzium-Level sowie die Akkumulation von IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*) (Kahn et al., 1999) in der  $\beta$ -Zell-Membran und weitere Mechanismen werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Die auftretenden metabolischen Abnormalitäten, wie Hyperglykämie und Hyperlipidämie, verstärken noch zusätzlich die schlechte  $\beta$ -Zell-Situation. Briaud et al. konnten z.B. zeigen, dass eine bestehende chronische Hyperglykämie zur Aktivierung des mTor-Signalweges (*mammalian Target of Rapamycin*) in der  $\beta$ -Zelle führt und es infolge dessen zur IRS-2-Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin (Ser) und Threonin (Thr) kommt (Briaud et al., 2005). Entgegen der physiologischen Phosphorylierung der IRS-2-Moleküle an Thyrosin (Lingohr et al., 2002; Lingohr et al., 2002) induziert die Ser/Thr-Phosphorylierung eine Degradation des IRS-2 und nachfolgend die  $\beta$ -Zell-Apoptose. Ebenso bedingt auch eine bestehende chronische Hyperlipidämie die  $\beta$ -Zell-Apoptose, da sie über die Aktivierung so genannter nPKC (*novel class of Protein Kinase C isoforms*) ebenfalls eine Ser/Thr-Phosphorylierung des IRS-2 bewirken kann (White, 2002; Zick, 2001). Andere glukolipotoxisch induzierte Mechanismen, wie die Entstehung von Ceramiden aus der Fettsäure Palmitat, tragen ebenfalls zur Verschlechterung der  $\beta$ -Zellfunktion und schließlich zu ihrer Destruktion bei (Unger and Zhou, 2001; Wrede et al., 2002).

Nicht zu unterschätzen ist die Rolle der pankreatischen  $\alpha$ -Zellen in der Pathogenese des T2DM. Aufgrund der  $\beta$ -Zelldysfunktion und gleichermaßen des  $\beta$ -Zellverlustes sowie der damit verbundenden nicht mehr vorhandenen inhibitorischen Wirkung des Insulins findet die Glukagon-Suppression nur eingeschränkt statt. Darüber hinaus zeigt sich eine Zunahme der relativen  $\alpha$ -Zellzahl in den Langerhansinseln (Deng et al., 2004; Guardado-Mendoza et al., 2009; Yoon et al., 2003). Diese Umstände bedingen eine Beschleunigung der T2DM-Pathogenese, da die gesteigerte Glukagonwirkung einen weiteren Anstieg des Blutglukosespiegels induziert (Surampudi et al., 2009).

Morphologisch betrachtet weist die pankreatische Insel während der T2DM-Manifestation eine desorganisierte Inselstruktur mit so genannten Amyloid-Plaques, eine reduzierte  $\beta$ -Zellzahl (Jaikaran and Clark, 2001; Kahn et al., 1999; Rhodes, 2005) und eine erhöhte

relative  $\alpha$ -Zellzahl auf (Clark et al., 1988). Zudem fördert die fortschreitende Zellzerstörung eine Infiltration von Immunzellen in das Inselgewebe (Ehse et al., 2009; Ehse et al., 2007).

Der Typ 2 Diabetes mellitus hat sich aufgrund seiner in den letzten Jahrzehnten zunehmenden Inzidenz, vor allem auch bei jüngeren Menschen (Alberti et al., 2004), zu einem weltweit großen gesundheitspolitischen Problem entwickelt (Zimmet et al., 2001).

Da der T2DM sowohl bei über- als auch normalgewichtigen Personen mit einer eingeschränkten  $\beta$ -Zellfunktion, wie auch einer inadäquat niedrigen  $\beta$ -Zellmasse, einhergeht (Butler et al., 2003), kommt dem Verständnis der physiologischen Adaptationsmechanismen der pankreatischen  $\beta$ -Zelle besonderes Interesse zu. Zum Studium solch physiologisch stattfindender Adaptationsvorgänge bietet beispielsweise die murine Schwangerschaft ein geeignetes Modell.

#### **1.4 Adaptation der $\beta$ -Zelle an den metabolischen Bedarf – Modell der murinen Schwangerschaft**

Die Fähigkeit, optimale Blutglukosespiegel unter verschiedenen metabolischen Gegebenheiten aufrecht zu erhalten, ist abhängig von einer adäquaten Insulinproduktion sowie Insulinsekretion. Dies wiederum erfordert eine angepasste  $\beta$ -Zellzahl und  $\beta$ -Zellgröße, zusammengefasst als  $\beta$ -Zellmasse, aber auch eine entsprechend angepasste  $\beta$ -Zellfunktion. Insulin selbst, Inkretine, Wachstumsfaktoren wie IGF (*Insulin-like Growth Factor*) oder EGF (*Epidermal Growth Factor*), Zellzyklusregulatoren, aber auch andere Hormone und Glukose sind Faktoren, über die diese Größen reguliert und an den Stoffwechsel gekoppelt werden (Bouwens and Rooman, 2005).

Unter Normbedingungen ist die  $\beta$ -Zellmasse relativ konstant. Dass sie jedoch, um eine metabolische Homöostase zu gewährleisten, sehr adaptiv ist, zeigt die auftretende Hyperinsulinämie infolge der Adipositas-assoziierten und auch nicht-adipösen Insulinresistenz. Im Zuge der Kompensierung kommt es bei Nagern (Pick et al., 1998) aber auch bei Menschen (Butler et al., 2003) zu einer Zunahme der  $\beta$ -Zellfunktion sowie zur Zunahme der  $\beta$ -Zellmasse. Ein Anstieg der  $\beta$ -Zellmasse kann auch durch einen mehr oder weniger kurzfristigen Mehrbedarf an Insulin, beispielsweise nach erhöhter Nährstoffzufuhr, ausgelöst werden. Ein Beispiel dafür bietet die glukoseinduzierte vorübergehende Hyperplasie und Hypertrophie pankreatischer  $\beta$ -Zellen bei Ratten. Hier bewirkte eine nur 24-stündige Glukoseinfusion eine reversible Zunahme der  $\beta$ -Zellmasse um 50 % (Bernard et al., 1999). Nach Wegfall des Glukosestimulus kam es rasch wieder zum Erreichen des Basalniveaus.

Auf zellulärer Ebene äußern sich die Adaptationsvorgänge durch eine verstärkte Synthese des Insulins, einen gesteigerten Glukosemetabolismus sowie verbesserte Sekretionsmechanismen.

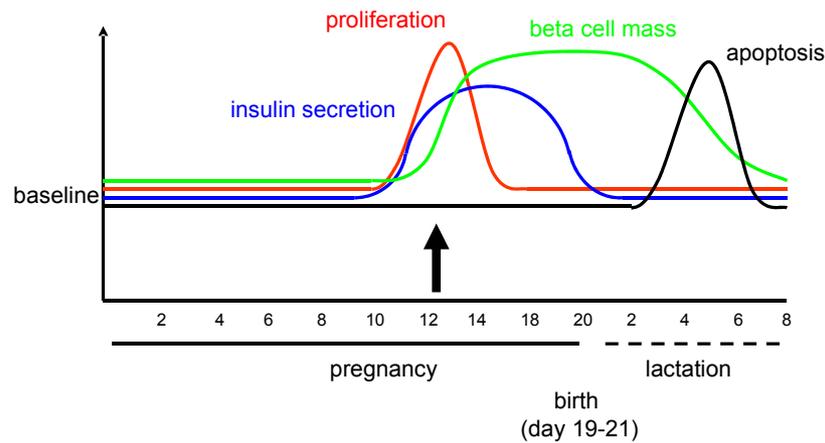
#### **1.4.1 Adaptationsvorgänge während der murinen Schwangerschaft**

Resultierend aus dem erhöhten Mehrbedarf an Insulin, angesichts der zunehmenden Insulinresistenz aufgrund des sich entwickelnden Fötus, kommt es, vor allem während der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, ausgelöst durch die Hormone Prolaktin und plazentares Laktogen (HPL, *human placental lactogen*), ebenfalls zu einer erhöhten  $\beta$ -Zell-Expansion (Parsons et al., 1995; Sorenson and Brelje, 1997), wohingegen andere endokrine Zellen diesbezüglich kaum Veränderungen unterliegen.

Vorwiegend Studien an Nagetieren konnten zeigen, dass die  $\beta$ -Zellmasse am Ende der Schwangerschaft um das 2-3-fache erhöht ist. Aber auch aus humanen Autopsien geht hervor, dass ähnliche Kompensationsmechanismen auch beim Menschen stattfinden (Van Assche et al., 1978).

Der enorme Anstieg der  $\beta$ -Zellmasse geht dabei mit einer bis zu 10-fach gesteigerten Proliferationsrate einher. Diese zeigt ihr Maximum, bei einer maximal 21 Tage dauernden murinen Schwangerschaft, zwischen dem Tag 10 bis 14 (Karnik et al., 2007; Kim et al., 2010) und wird ebenfalls von einer stark erhöhten Sekretionskapazität seitens der  $\beta$ -Zellen begleitet (Abb.3.1). Innerhalb weniger Tage nach Beendigung der Tragezeit führt ein relativ schneller Abfall der  $\beta$ -Zellmasse dazu, dass rasch wieder Ausgangsniveau erreicht wird. Besonders apoptotische Prozesse, neben einer verminderten Proliferation, zeigen sich für diesen  $\beta$ -Zellverlust verantwortlich (Bonner-Weir, 2000).

Da ein  $\beta$ -Zellverlust, aber auch eine eingeschränkte Insulinsekretion offensichtlich zur Pathogenese des Diabetes beitragen, könnten diejenigen adaptiven Prozesse und Faktoren, welche die enorme  $\beta$ -Zellproliferation, aber auch verbesserte –funktion während der Schwangerschaft bedingen, Schlüssel-moleküle und –mechanismen für die pharmakologische Behandlung dieser Krankheit darstellen.



**Abb. 1.3 Physiologische Adaptationsvorgänge endokriner  $\beta$ -Zellen während der murinen Schwangerschaft.**

Im Zuge des erhöhten Bedarfs an Insulin kommt es, aufgrund gesteigerter Proliferationsvorgänge, zwischen dem 10.-14. Tag einer durchschnittlich 20 Tage dauernden Schwangerschaft bei Mäusen zu einem erheblichen Anstieg der  $\beta$ -Zellmasse. Eine verstärkte Apoptose bedingt nach Beendigung der Schwangerschaft einen schnellen Abfall der  $\beta$ -Zellmasse auf das Ausgangsniveau (Lechner, unveröffentlichte Ergebnisse).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist schon heute eine der weltweit am häufigsten auftretenden Stoffwechselerkrankungen. Trotz einer intensiven Forschung, vielfältiger Therapien und Medikamente ist sie bisher nur ungenügend behandelbar und geht nicht selten mit diabetesassoziierten Sekundärerkrankungen einher. Funktionsstörungen der pankreatischen Inseln tragen wesentlich zur Pathogenese des T2DM bei. Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist daher, unser Verständnis der molekularen Mechanismen und Faktoren, welche die Differenzierung und den Funktionserhalt des endokrinen Pankreas regulieren, zu verbessern.

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Pax6 ein wesentlicher Regulator der Differenzierung des endokrinen Pankreas ist. Eine Inaktivierung von Pax6 führt zu erheblichen morphologischen Veränderungen der Inselarchitektur und zu einer nachweislichen Veränderung der Zahl aller endokrinen Zellen (St-Onge et al., 1997). Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung der beiden DNA-Bindedomänen sowie der Transaktivierungsdomäne von Pax6 für die Entwicklung des endokrinen Pankreas. Zu diesem Zweck wurden überwiegend *in vivo* Studien am embryonalen Pankreas verschiedener Mauslinien durchgeführt, die entweder eine Mutation in der Paired-, der Homöo- oder der Transaktivierungsdomäne dieses Transkriptionsfaktors aufwiesen.

Der zweite Teil dieser Arbeit fokussierte sich auf die Identifizierung und die funktionelle Charakterisierung neuer  $\beta$ -Zell-Gene bzw. -Proteine, welche eine regulatorische Aufgabe bei der Proliferation sowie der Funktion pankreatischer  $\beta$ -Zellen übernehmen. Da sowohl eine verminderte Proliferationsrate bei einer gesteigerten Apoptose als auch ein Funktionsverlust der  $\beta$ -Zellen entscheidend für die Pathogenese des T2DM sind, könnten entsprechende Regulatorproteine auch denkbare Angriffspunkte der Diabetes-Therapie darstellen. Als Basis zur Identifizierung entsprechender Kandidatengene dienten uns vergleichende Expressionsprofile ruhender und proliferierender Langerhansinseln. Anhand dieser Expressionsprofile wurde eine Auswahl von 4 Kandidatengenen getroffen, die in pankreatischen Inseln mit niedriger Apoptose, gesteigerter Proliferationsaktivität sowie hoher Insulinsekretion, im Vergleich mit entsprechenden Kontrollinseln, entweder signifikant höher oder niedriger exprimiert werden. Diese Kandidatengene sollten *in vitro* funktionell charakterisiert werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf ein neu identifiziertes Regulatorprotein, Eny2, gerichtet, welches im Hinblick auf die Insulinsekretion pankreatischer  $\beta$ -Zellen detaillierter untersucht werden sollte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Cellulose Chromatography Papier	Whatmann
Cloning-Stanzzylinder: - Pyrex 8,8 mm	Corning Life Science
Cryoröhrchen	Nunc
Deckgläser: - eckig	Menzel-Gläser
- rund	Saur Laborbedarf
Drigalskispatel	Merck
Filterpapier	Whatman
Impföse	Greiner
Injektionskanülen (30G)	Braun
Objekträger: - SuperFrost®Plus	VWR
Pasteurpipetten (Glas und Plastik)	VWR
Petrischalen	Roth
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	
- ohne Filter	Eppendorf
- mit Filter	Neolab
Reaktionsgefäße:	
- 1,5 und 2ml	Eppendorf
- PCR-Reaktionsgefäße	VWR
Röntgenfilme: - Amersham Hyperfilm™ECL	GE Healthcare
Scalpell	Feather
Spritzen: - Discardit™II (5ml)	BD Bioscience
Stabpipetten (Stripetten)	Corning Life Science
Sterilfilter (0,2 µm und 0,45 µm)	Millipore
Western-Blot-Membran:	
- Immobilion PVDF Membran	Millipore
Zählkammer: - Neubauer	Hycor Biomedical
Zellkulturflaschen	TPP
Zellkulturplatten:	
- Ø 10 und 15cm	TPP
- 6-, 24-, 96-Well	TPP
Zellkulturröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner
Zellschaber	Sarstedt

**2.1.2 Geräte**

Brutschrank: - B15	Thermo Electron Cooperation/ Binder
- APT-Line™ KBF Binder Zellkultur	
Bunsenbrenner	Usbeck
Elektrophoresekammer für Agarosegele	
- MGU-402T	C.B.S. Scientific Company
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE:	
- Mini Protean 3 Cell System	Bio-Rad
Filmentwicklungsmaschine:	
- Curix60	AGFA Health Care/Berlin
Fluorometer. - Qubit	Invitrogen
Inkubationsschüttler:	
- KS15A	Edmund Bühler GmbH
- LS20	Gerhard
Küvetten (Acryl)	Eppendorf
Magnetrührer: - Combimag RET	IKA
Mikroskope: - Standard-Labormikroskop BX41	Olympus
- Stereomikroskop SMZ-140	Motic
- Steromikroskop Bo61	Olympus
- Axioskop 40	Carl Zeiss/Jena
- Laser Scanning Mikroskop	Leica
Microplate Reader:	
- Magellan2	Tecan
Netzgerät für Elektrophoresekammern: E831	Consort
pH-Meter	HANNA Instruments
Pipettierhilfe: - Pipetboy comfort	IBS Integra Biosciences
Photometer	Eppendorf/Hamburg
Präparationsbesteck	Adolf Bausch
Schüttler: - Shaker TH15	Edmund Bühler
Sterilwerkbank:	
-LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus
Thermozykler:- PxE 0,2 Thermal Cycler	Thermo Scientific
UV-Dokumentationsgerät/Transilluminator	UVP Inc.
Waagen: - Analysewaage	Satorius
- Feinwaage TE412	Satorius
Wasserbad	Medingen
Western-Blot-Transferkammer:	

	- Mini Transblot Cell System	Bio-Rad
Zentrifugen:	- Kühlzentrifuge Labofuge 400 R	Heraeus
	- Kühlzentrifuge Micro 200 R	Hettich
	- Tischzentrifuge	Heraeus

### 2.1.3 Software

Erstellung von Abbildungen:	AdobePhotoshop CS
Erstellung von Diagrammen:	Sigma Plot 8.0
Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie:	LSM510 Version 3.2 SP2
Sequenzdatenvergleich / Alignment	Vector NTI

#### Webtools:

Sequenzdatensuche	NCBI ( <i>national centers for biotechnology information</i> ; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Erstellung von Oligonukleotidsequenzen:	Primer3 Version 0.4.0) <a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>
Sequenzdatenvergleich	ClustalW <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

### 2.2.1 Laborchemikalien

Acrylamid-Bis-Lösung (30 %)	Bio-Rad
Agarose Low Melt	Roth
Agarose (NEEO Ultraqualität)	Roth
Albuminfraktion V (BSA)	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Aqua ad iniectabilia	Braun
Calciumchloriddihydrat	Roth
Collagenase V (aus <i>Clostridium histolyticum</i> )	Sigma-Aldrich
Complete, EDTA-free (protease inhibitor cocktail tablets)	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
Doxycycline	Clontech

---

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol absolute	Merck
Ethidiumbromid (1 %-Lösung)	Roth
Fluorescent Mounting Medium	Medac GmbH
Fötales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert	PAA
Gelatine	Roth
Geneticindisulfat-Lösung (G418, 50 mg/ml)	Roth
Glukose D-(+)	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
HEPES	Roth
Hanks`BSS (1x; +Ca, +Mg, -Phenol Red)	PAA
HEPES (1 M, pH 7,4)	PAA
Hygromycin	Clontech
Isofluran (Forene®)	Abbott AG
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Lipofectamin RNAi MAX	Invitrogen
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Magnesiumchloridhexahydrat	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
2-Methyl-2-Butanol	Fluka
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAA

dNTP Set, PCR Grade	Qiagen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100x Konzentrat)	PAA
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, + Phenolrot)	PAA
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, - Phenolrot)	PAA
Roti®Fect Plus Transfektionsagenz	Roth
Roti®-Load DNA (m. Glycerin) 6x Agarose-Gelladepuffer	Roth
Roti®-Load 2 4x SDS-PAGE Ladepuffer (nicht reduzierend )	Roth
Salzsäure (≥ 32 %)	Roth
TEMED	Roth
Thiazolylblau (MTT)	Sigma-Aldrich
2,2,2-Tribromoethanol	Sigma-Aldrich
Tris (Ultra Qualität)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin-EDTA (1:250)	PAA
Tween®20	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Roth
Xylol	Roth

Weitere Chemikalien, bzw. Reagenzien wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

## 2.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Aktivatoren, bzw. Inhibitoren zur Stimulation verschiedener Teilschritte der Insulinsekretion von INS-1E-Zellen verwendet.

**Tabelle 2.1 Verwendete Aktivatoren und Inhibitoren.**

Name	Wirkung	Eingesetzte Konzentration	Firma
• Forskolin	AC-Aktivator	10 µM	Sigma-Aldrich
• IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	PDE-Inhibitor	100 µM	Sigma-Aldrich

• 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyladenosin-3',5'-cyclic Monophosphat)	Epac-Aktivator	100 µM	Biolog Life Science Institut
• N6-Benzoyl-cAMP (N6-Benzoyladenosen-3',5-cyclic Monophosphat)	PKA-Aktivator	100 µM	Biolog Life Science Institut
• H-89	PKA-Inhibitor	10 µM	Calbiochem
• Tolbutamid	K <sub>v</sub> -Kanal-Inhibitor	250 µM	Sigma
• Diazoxid	K <sub>v</sub> -Kanal-Öffner	250 µM	Sigma
• Exendin-4	GLP1-Rezeptor-Agonist	0,001-50 nM	Byetta <sup>®</sup> , Lilly

### 2.2.3 Enzyme

**Tabelle 2.2 Verwendete Enzyme.**

Enzym	Art	Firma
DNase I	DNA-Enzym	Qiagen
Reverse Transkriptase	PCR-Enzym	Promega
Taq-DNA-Polymerase	PCR-Enzym	Qiagen
Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase	PCR-Enzym	Finnzymes
<i>Pfx50</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	PCR-Enzym	Invitrogen
<i>AatII</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>Scal</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>EcoRV</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>BstEII</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
<i>NotI</i>	Restriktionsenzym	New England Biolabs
CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Phosphataseenzym	Invitrogen

T4 Quick DNA-Ligase	Ligationsenzym	New England Biolabs
---------------------	----------------	---------------------

## 2.2.4 Antikörper und Seren

### 2.2.4.1 Primäre Antikörper und Seren

**Tabelle 2.3** Verwendete primäre Antikörper sowie Seren.

Antikörper Serum	gegen/ Spezies	Verwendung	Verdün- nung	Firma
• HA-Tag	Maus	Westernblot (WB)	1:500	New England Biolabs
• $\beta$ -Aktin	Maus	WB Immunfluoreszenz	1:20000 1:500	Sigma-Aldrich
• Amylase	Ziege	Immunfluoreszenz	1:200	Santa Cruz
• Insulin	Meerschwein	Immunfluoreszenz	1:1000	Dako
• Glukagon	Meerschwein	Immunfluoreszenz	1:1000	Linco
• Glukagon	Hase	Immunfluoreszenz	1:500	Dako
• Glukagon	Hase	Immunfluoreszenz	1:500	Chemicon
• Ghrelin	Ziege	Immunfluoreszenz	1:200	Santa Cruz
• Pax6	Hase	Immunfluoreszenz	1:2500	Chemicon
• Somatostatin	Hase	Immunfluoreszenz	1:100	Chemicon
• Pankreatisches Polypeptid	Hase	Immunfluoreszenz	1:30	Millipore
	Ziege	Immunfluoreszenz	1:100	Santa Cruz
• TetR	Maus	WB	1:1000	Clontech
• Normal Donkey Serum		Immunfluoreszenz	1:250	Jackson Immuno Research

### 2.2.4.2 Sekundäre Antikörper und Kernfarbstoffe

Für die Western-Blot-Analyse wurde Meerrettichperoxidase- (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelter Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG-HRP (Santa Cruz) in der Verdünnung 1:10000 verwendet.

Für die Immunfluoreszenz wurden Cy3 konjugierte Esel-anti-Maus, Esel-anti-Ziege, Esel-anti-Meerschwein, Esel-anti-Hase und Cy2 konjugierte Esel-anti-Meerschwein, Esel-anti-Ziege, Esel-anti-Hase Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research) jeweils in der Verdünnung 1:1500 eingesetzt.

Die Kernfärbung Immunfluoreszenz-markierter Präparate erfolgte mit Dapi (Sigma Aldrich) oder TOPRO<sup>®</sup>-Iodid (Invitrogen) in den Verdünnungen 1:10000 bzw. 1:2500.

Für Markierungen von  $\beta$ -Aktin wurde außerdem noch Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes) in einer 1:40 Verdünnung angewendet.

## 2.2.5 Verwendete Kits

**Tab. 2.4 Verwendete Kits.**

Name	Anwendung	Firma
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cyclic AMP Competitive ELISA</li> </ul>	ELISA / Konzentrationsbestimmung	Thermo Scientific
<ul style="list-style-type: none"> <li>ECL Plus Western Blotting Detection System</li> </ul>	Immundetektion	Amersham Biosciences
<ul style="list-style-type: none"> <li>ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcription System</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	Promega
<ul style="list-style-type: none"> <li>Phusion<sup>™</sup>Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase Kit</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	Finnzymes
<ul style="list-style-type: none"> <li>Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	New England Biolabs
<ul style="list-style-type: none"> <li>Qiafilter Plasmid Midi Kit</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
<ul style="list-style-type: none"> <li>Qiaquick Gel Extraction Kit</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
<ul style="list-style-type: none"> <li>Qiaquick PCR-Purification Kit</li> </ul>	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
<ul style="list-style-type: none"> <li>Quant-iT<sup>™</sup>dsDNA HS Assay Kit</li> </ul>	Konzentrationsbestimmung	Invitrogen
<ul style="list-style-type: none"> <li>Quant-iT<sup>™</sup>dsDNA BR Assay Kit</li> </ul>	Konzentrationsbestimmung	Invitrogen

---

• Quant-iT <sup>TM</sup> RNA Assay Kit	Konzentrationsbestimmung	Invitrogen
• Quant-iT <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Konzentrationsbestimmung	Invitrogen
• Quick Ligations Kit	Gentechnische Arbeiten	New England Biolabs
• Quicklyse Miniprep Kit	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
• Rat/Mouse Insulin ELISA Kit	ELISA / Konzentrationsbestimmung	Linco Research bzw. Millipore
• Ultra sensitive mouse insulin ELISA Kit	ELISA / Konzentrationsbestimmung	Crystal Chem. Inc.
• RNeasy Plus Mini Kit	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
• Taq PCR Core Kit	Gentechnische Arbeiten	Qiagen
• Tet-Off Advanced Inducible Gene Expression System	Herstellung induzierbarer stabiler Zelllinien	Clontech
• Luciferase-Assay Kit	Überprüfung induzierbarer stabiler Zellklone	Promega

---

### 2.2.6 Häufig verwendeter Puffer

- PBS (Phosphate Buffered Saline)
  - 137 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 2,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## 2.3 Biologische Materialien

### 2.3.1 Oligonukleotide

#### 2.3.1.1 Primer

Alle die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden unter Angabe der gewünschten Sequenz, Aufreinigungsmethode etc. von der Firma Metabion bezogen und sind in den Tabellen 2.5-2.8 zusammengefasst.

Für die Analyse und semiquantitative Analyse der Genexpression mittels rtPCR wurde die aus der mRNA gewonnene cDNA mit den nachfolgenden Primern amplifiziert (Tabelle 2.5). Die Konstruktion dieser Primer erfolgte unter der Berücksichtigung gewisser Standards, wie einer Länge von 18-24 Nukleotiden, der Einhaltung eines ausgeglichenen A/T zu G/C-Gehaltes sowie dem Ausschluss von Homodimer-, Heterodimer- oder interner Haarnadelschleifenbildung, mithilfe des Webtools Primer3.

**Tab. 2.5 Für die rtPCR und semiquantitative rtPCR verwendete Primer.** Die mit einem Stern gekennzeichneten Primer wurden außerdem auch zur Sequenzierung herangezogen

Gen	Primername	Primersequenz (5' → 3')
GAPDH (Maus)	5'GAPDH mus musculus	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
	3'GAPDH mus musculus	ACACATTGGGGGTAGGAACA
Commd7 (Maus)	5'-Commd7 NEU mus musculus*	GGAGCAGTGAATTAGAGAAAG
	3'-Commd7 mus musculus*	CGTCTGGCCTCAGTTCTTTC
1110008P14Rik (Maus)	5'-Rik mus musculus*	AAGAATGACCACCTCCATGC
	3'-Rik mus musculus*	CATGGCCTAGAGAGGTGAGG
Tcf25 (Maus)	5'-Tcf25 mus musculus*	CCTGATACAGCAGGCACTCA
	3'-Tcf25 mus musculus*	TGACCTCCCCAGGTACAGAC
Eny2 (Maus)	5'-Eny2 NEU mus musculus*	CTGTTGATGACTTGGTGCC
	3'-Eny2 mus musculus*	TTCAGCCACCAAGTCATCAA
GAPDH (Ratte)	5'GAPDH rattus norvegicus	GGCATTGCTCTCAATGACA
	3'GAPDH rattus norvegicus	TGTGAGGGAGATGCTCAGT
Commd7 (Ratte)	5'-Commd7 rattus norvegicus	TCCAAATGGTGCATTGAAGA
	3'-Commd7 rattus norvegicus	ACGTCACTCCAAACCTCCAC
1110008P14Rik (Ratte)	5'-Rik rattus norvegicus	GCCCCACCCTTACCTCTCTA
	3'-Rik rattus norvegicus	GCACCTGACTCCAGGAAGAG

---

Tcf25 (Ratte)	5'-Tcf25 rattus norvegicus	AGTCCATGGAGCCAAACAAC
	3'-Tcf25 rattus norvegicus	GTGGAACACACACTCCATGC
Eny2 (Ratte)	5'-Eny2 rattus norvegicus	CTTAGGTGCCCGAGCTACTG
	3'-Eny2 NEU rattus norvegicus	TTGCTAACCACCATCACCGC
Insulin (Ratte)	5'-Ins 1 rattus norvegicus	CACCTTTGTGGTCCTCACC
	3'-Ins 1 rattus norvegicus	CCAGTTGGTAGAGGGAGCA
Glukagon (Ratte)	5'-Gluc rattus norvegicus	AACAACATTGCCAAACGTC
	3'-Gluc rattus norvegicus	CAGCTATGGCGACTTCTTC
Pdx1 (Ratte)	5'-Pdx 1 rattus norvegicus	GGCTTAACCTAAACGCCA
	3'-Pdx 1 rattus norvegicus	GGGACCGCTCAAGTTTGT
Glukokinase (Ratte)	5'Glukokinase rat	TCAGGACTTGCACTTTCACG
	3'Glukokinase rat	ACTCTCCTGGGGTCTGGTCT
Glukosetransporter 2 (Ratte)	5'Glut2 rat	AATTTTCATCATCGCCCTCTG
	3'Glut2 rat	GTCTCTGATGACCCCAGGAA
Phosphofruktokinase (Ratte)	5'Phosphofruktokinase rat	CCTGGAGGCCATTGTAGAAA
	3'Phosphofruktokinase rat	GGACATTGTTGCTGATGGTG
Cyklophilin (Ratte)	5'Cyclophilin rat	GTGTGTGGTCTTTGGGAAGG
	3'Cyclophilin rat	TACAGGGTATTGCGAGCAGA
Beta-Aktin (Ratte)	5'beta Aktin rat	AGCCATGTACGTAGCCATCC
	3'beta Aktin rat	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA

---

**Tabelle 2.6 Verwendete Klonierungsprimer.** Für die Klonierung der gewählten Kandidatengene kamen folgende Primer zum Einsatz, bei denen die Restriktionsschnittstelle jeweils unterstrichen ist.

Gen	Primername	Restrictionsschnittstelle	Primersequenz (5'→3')
Commd7	Commd7_F	<i>Bam</i> HI	TAAT <u>GGATCC</u> TGGCACCATGGGCCGCT
	Commd7_R2	<i>Bst</i> EII	GCT AAA <u>GGTAACC</u> A GCT GAG GCA CTC CAT GCT C
1110008P14Rik	Rik_F	<i>Bam</i> HI	TAAT <u>GGATCC</u> AGCCCAATGTCTGGGCCCAA
	Rik_R	<i>Eco</i> RV <i>Bst</i> EII	TTTTGATATCAGGCGTAATCCGGGACA TCGTACGGGTAC <u>GGTAACC</u> AGGGGCT GGCATCGCCAGG
Tcf25	Tcf_F	<i>Bam</i> HI	TAAT <u>GGATCC</u> GGTCTATGTCTCGCGCCGG
	Tcf_R2_Bst	<i>Bst</i> EII	GCTAAAGGTA <u>ACCACAGCTCTGTGGT</u> GTAATTT
Eny2	Eny2_F	<i>Bam</i> HI	GGCCAT <u>GGATCC</u> GCGGTGATGGTGGTTAGCAAG
	Eny2_HA_R	<i>Eco</i> RV <i>Bst</i> EII	TTTTGATATCAGGCGTAATCCGGGACA TCGTACGGGTAC <u>GGTAACC</u> AAAGGCT GGCATGCTGAGC

**Tabelle 2.7 Zur Mutagenese-PCR verwendete Primer.** Die aufgelisteten Primer wurden für die gerichtete Mutagenese doppelsträngiger Plasmid-DNA konstruiert unter Beachtung der Angaben Finnzymes, dem Mutagenese-Kit Hersteller.

Primername	Primersequenz (5'→3')	Ziel der Mutagenese
Pax6_M_F	P-GTGTCAATCAATAAACAGAGTTCTTCGCA	Deletion des Exon 5 und 6 des Pax6-Gens
Pax6_M_R	P-CTGCAGAATTCGGGAAATGTCGCAC	Deletion des Exon 5 und 6 des Pax6-Gens

**Tabelle 2.8 Verwendete Sequenzierungs-Primer.** Zur Sequenzierung wurden die nachfolgenden Primer verwendet. Die Mit einem Stern gekennzeichneten Primer dienten außerdem noch als Primer bei der Kolonie-PCR.

Primername	Primersequenz (5'→3')
Sp6*	GATTTAGGTGACACTATAG
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
M13	GTAAAACGACGGCCAG
T7*	TAATACGACTCACTATAGGG

### 2.3.1.2 siRNAs

**Tabelle 2.9 Verwendete siRNA's.**

Zielgen	siRNA-Name	Sequenz	Position innerhalb der kodierenden Region des Gens ausgehend vom Startcodon
Eny2	Eny2-siRNA1	CUGUAAAGAGGUAAUUAAtt	43 bp – 61 bp
Eny2	Eny2-siRNA3	AAAGGACUAGAACACGUUAtt	169 bp – 187 bp
-----	Ko-siRNA	AAUUGUUCGACUUUCUUGG	-----

## 2.3.2 Expressionsvektoren und Plasmide

### 2.3.2.1 Erworbene Plasmide

pcDNA3 (Invitrogen):

5,4 kb großer Expressionsvektor mit Cytomegalovirus-Promotor (CMV-Promotor), welcher uns als Ausgangsplasmid für die transiente als auch für die konstitutiv stabile Überexpression der Kandidatengene diente. Um ein Expressionskonstrukt zu erhalten, in denen die Kandidatengen-cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven Cytomegalovirus (CMV)-Promotor steht, wurde die Kandidatengen-cDNA in die MCS (multiple cloning site) des pcDNA3 Vektor kloniert. Zusätzlich

---

	enthält dieser Vektor je ein Ampicillin- und Neomycinresistenzgen.
pEGFP-N1	4,7 kb großer Expressionsvektor mit CMV-Promotor. In die MCS dieses Vektors integrierte Gene werden als Fusionsproteine mit N-terminalem EGFP-Anteil exprimiert. Dieser Vektor enthält außerdem ein Gen für die Neomycinresistenz.
pMXIG-Pax6 (AG M.Götz, München-Neuherberg)	7,3 kb großer Vektor, in welchen das vollständige Pax6 Gen integriert ist. Leider fehlten uns bis auf die Restriktionsschnittstellen der MCS jegliche Informationen über diesen Vektor.
pYX-Asc-Commd7 (RZPD)	1691 bp großer Vektor mit T3- und T7-Promotor, der zusätzlich die kodierende Sequenz (CDS) des Kandidaten-Gens Commd7 (COMM domain containing 7) der Spezies <i>mus musculus</i> (Gen-ID: 99311; NCBI-Zugangsnummer: NM_133850) und ein Ampicillinresistenzgen enthält.
pCMV-SPORT6-1110008P14Rik (RZPD)	4396 bp großer Vektor mit M13- und Sp6-Promotor, der zusätzlich die CDS des Kandidaten-Gens 1110008P14Rik (Riken cDNA 1110008P14) der Spezies <i>mus musculus</i> (Gen-ID: 73737; NCBI-Zugangsnummer: NM_198001) und ein Ampicillinresistenzgen enthält.
pYX-Asc-Tcf25 (RZPD)	enthält zusätzlich die CDS des Kandidaten-Gens Tcf25 (transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)) der Spezies <i>mus musculus</i> (Gen-ID: 66855; NCBI-Zugangsnummer: NM_001037877).
pCMY-SPORT6-Eny2 (RZPD)	enthält zusätzlich die CDS des Gens Eny2 (enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila)) der Spezies <i>mus musculus</i> (Gen-ID: 223527; NCBI-Zugangsnummer: NM_175009).

pTet-Off-Advanced (Clontech)	7,1 kb großer Vektor, welcher das 28 kDa große Transkriptions-aktivierende Fusionsprotein tTA- (tetracycline-controlled transaktivator) Advanced enthält, welches spezifisch an das TRE (Tet-Response Element) des pTRE-Tight-Vektors bindet und in Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin, bzw. Doxyzyklin die Transkription des GOI (Gene Of Interest) aktiviert. Zusätzlich enthält dieser Vektor ein Neomycin- und Ampicillinresistenzgen.
pTRE-Tight (Clontech)	2,6 kb großer Vektor, welcher die regulatorische Sequenz, das TRE sowie einen minimal CMV-Promotor und eine MCS, in welche das interessierende Gen (GOI) integriert wird sowie ein Ampicillinresistenzgen enthält.
pTRE-Tight-Luc (Clontech)	pTRE-Tight-Vektor welcher zusätzlich das Gen für das Luciferase-Protein enthält

### 2.3.2.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pcDNA3-Pax6+E6	pcDNA3-Vektor mit dem vollständigen Pax6-Gen als Insert zwischen der <i>Bam</i> HI- und der <i>Not</i> I-Restriktionsschnittstelle.
pcDNA3-Pax6 $\Delta$ E6	pcDNA3-Vektor mit Pax6-Gen mit Deletion des Exon 5 und 6. Entstand durch entsprechende Mutagenese-PCR des pcDNA3-Pax6+E6-Plasmids.
pcDNA3-Commd7-HA	pcDNA3-Vektor mit zwischen <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle integrierter Commd7-cDNA mit fusioniertem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) mit dazwischenliegender <i>Bst</i> EII-Schnittstelle.
pcDNA3-Commd7	pcDNA3-Vektor mit Commd7-Gen als Insert. Entstand durch den Verdau des pcDNA3-Commd7-HA-Vektor mit <i>Bst</i> EII und <i>Eco</i> RV.

pcDNA3-1110008P14Rik-HA	pcDNA3-Vektor mit zwischen <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle integrierter 1110008P14Rik-cDNA mit fusioniertem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) mit dazwischenliegender <i>Bst</i> EII-Schnittstelle.
pcDNA3-1110008P14Rik	pcDNA3-Vektor mit 1110008P14Rik als Insert. Entstand durch den Verdau des pcDNA3-1110008P14Rik-HA-Vektors mit <i>Bst</i> EII und <i>Eco</i> RV
pcDNA3-Tcf25-HA	pcDNA3-Vektor mit zwischen <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle integrierter Tcf25-cDNA mit fusioniertem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) mit dazwischenliegender <i>Bst</i> EII-Schnittstelle.
pcDNA3-Tcf25	pcDNA3-Vektor mit Tcf25 als Insert. Entstand durch den Verdau des pcDNA3-Tcf25-HA-Vektors mit <i>Bst</i> EII und <i>Eco</i> RV
pcDNA3-Eny2-HA	pcDNA3-Vektor mit zwischen <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle integrierter Eny2-cDNA mit fusioniertem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) mit dazwischenliegender <i>Bst</i> EII-Schnittstelle.
pcDNA3-Eny2	pcDNA3-Vektor mit Eny2 als Insert. Entstand durch den Verdau des pcDNA3-Eny2-HA-Vektors mit <i>Bst</i> EII und <i>Eco</i> RV
pTRE-Tight-Eny2	pTRE-Tight-Vektor in dessen MCS über die <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I-Restriktionsschnittstellen die Eny2-cDNA integriert wurde.
p-TRE-Tight-Tcf25	pTRE-Tight-Vektor in dessen MCS über die <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I-Restriktionsschnittstellen die Tcf25-cDNA integriert wurde.

Alle hergestellten Plasmide mit dem Ausgangsplasmid pcDNA3 besitzen, wie der Ausgangsvektor selbst, jeweils ein Gen für die Ampicillin- und Neomycinresistenz.

### 2.3.3 Bakterienstamm

Klonierungen wurden, da Plasmide verwendet wurden, welche eine Größe von 10 kb unterschritten, mit dem bereits kompetenten *E. coli* Stamm Subcloning Efficiency™DH5α™ (Invitrogen) durchgeführt.

Bakteriengenotyp: F-Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 rel A1*λ<sup>-</sup>

### 2.3.4 Zelllinien

- INS-1E-Zellen Ratteninsulinomzellen  
(C. Wollheim, Universität Genf, Schweiz)

### 2.3.5 Tierstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Mausstämme verwendet, welche der institutseigenen Zucht des Helmholtz Zentrum München-Neuherberg entstammten. Für den Nachweis der im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene fanden C57BL/6-Mäuse Anwendung, welche über die Firma Charles River bezogen wurden. Alle Tiere wurden bei 23°C und einem 12-stündigem Hell-/Dunkelrhythmus gehalten und hatten ständigen Zugang zu Standardnahrung und Wasser. Sowohl die Haltung als auch die an und mit ihnen durchgeführten Versuche, bzw. Gewebeentnahmen waren behördlich genehmigt und entsprachen sowohl den gesetzlich als auch den institutseigenen determinierten Richtlinien.

Im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit, hinsichtlich der Rolle der verschiedenen Pax6-Domänen für die Differenzierung des endokrinen Pankreas, wurden Mäuse mit C3HeB/FeJ-Hintergrund verpaart, welche heterozygote Träger entweder der Pax6<sup>Aey18</sup>, Pax6<sup>Sey-Neu</sup>, Pax6<sup>4Neu</sup> oder Pax6<sup>132-14Neu</sup>-Mutation waren. Die eigentliche Analyse fand an 18,5 Tage alten Embryonen (E 18,5), homozygot für eine der aufgeführten Pax6-Mutationen, im Vergleich zu entsprechenden Wildtyptieren statt. Die Identifizierung der Embryonen als Wildtyp, heterozygote, bzw. homozygote Träger der entsprechenden Pax6-Mutation erfolgte dabei anhand ihres Augen-Phänotyps. Da sich Individuen mit homozygoter Pax6<sup>132-14Neu</sup>-Mutation nach der Geburt als lebensfähig präsentierten, wurden in diesem Fall 6 Wochen alte Tiere analysiert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels PCR

Um spezifisch eine DNA-Sequenz zu amplifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene PCR's durchgeführt, die im Wesentlichen alle dem gleichen Prinzip folgen. Zwei gegenläufige Primer binden sequenzspezifisch an die DNA (Annealing), welche nachfolgend von der DNA-Polymerase kopiert wird (Elongation). Der entstandene DNA-Abschnitt dient nun seinerseits ebenfalls als Matrizenstrang, so dass die ursprüngliche DNA-Sequenz nach und nach vervielfältigt (amplifiziert) werden kann.

Standard PCR-Ansatz:

<u>Komponenten</u>	<u>Endkonzentration</u>
PCR-Puffer (10x)	1x
dNTPs (10 mM)	0,3 mM
<i>Forward-</i> (5'-) Primer (100 pmol/μl)	0,3 - 0,5 μM
<i>Reverse-</i> (3'-) Primer (100 pmol/μl)	0,3 - 0,5 μM
DNA-Polymerase	2,5 - 5 U
DNA	50 ng -100 ng
Aqua dest	x μl
Endvolumen:	18 - 100 μl

Die eingesetzten Volumina sowie Konzentrationen der verschiedenen Komponenten dieses Standard PCR-Ansatzes wurden entsprechend den verwendeten Kits und DNA-Polymerasen nach den Angaben der Hersteller variiert, bzw. nach angewandter PCR modifiziert.

#### 2.4.1.1 Klonierungs-PCR

- Kit: Pfx50<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase-Kit (Invitrogen)  
mit Pfx50<sup>TM</sup>  
DNA-Polymerase
- Art der eingesetzten DNA: Plasmid-DNA
- Endvolumen: 50-100 μl

Eine Klonierungs-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um Kandidatengene aus dem kommerziell bezogenen Plasmid zu isolieren, zu amplifizieren und gleichzeitig für die Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor zu gestalten. Dafür wurden Primer konstruiert, die einerseits Restriktionsschnittstellen, andererseits aber auch einen HA-Tag,

zur Visualisierung des Kandidatengens auf Proteinebene, an das interessierende Gen fusionieren. Zur Realisierung der Genauigkeit dieser PCR wurde die Pfx50<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet, die sich gegenüber der Taq-Polymerase, aufgrund ihrer 3'→5' *Proofreading*-Exonuklease-Aktivität, durch eine weit größere Genauigkeit auszeichnet.

#### 2.4.1.2 Kolonie PCR

- Kit: Taq Core Kit (Qiagen) mit Taq-DNA-Polymerase
- Art der eingesetzten DNA: Plasmid-DNA
- Endvolumen: 18 µl

Mittels Kolonie-PCR kann auf schnelle Art der Erfolg einer Klonierung überprüft werden. Dafür wurde eine einzelne Kolonie transformierter, auf selektiven LB-Agarplatten gewachsener Bakterien mittels sterilem Zahnstocher angeimpft, zunächst zur weiteren Vermehrung auf einen kleinen gekennzeichneten Bereich einer neuen selektiven LB-Agarplatte ausgestrichen und dann in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem PCR-Reaktionsansatz übertragen. Das Primerpaar dieses Reaktionsansatzes wurden so gewählt, dass einer der Primer innerhalb des interessierenden DNA-Abschnittes bindet, während der gegenläufige Primer auf einem Abschnitt des zur Klonierung verwendeten Plasmides hybridisiert, welcher das interessierende DNA-Fragment flankiert.

#### 2.4.1.3 Reverse Transkriptase (rt)PCR und semiquantitative rtPCR

- Kit: Taq Core Kit (Qiagen) mit Taq-DNA-Polymerase
- Art der eingesetzten DNA: cDNA
- Endvolumen: 18 µl

Diese PCR diene dem Nachweis der Expression bestimmter Gene in eukaryontischen Zellkulturen, murinen Langerhansinseln oder murinen embryonalen Pankreata oder wurde angewandt, um die Stärke der Expression bestimmter Gene semiquantitativ unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen. Wie nachfolgend aufgeführt (2.4.11), wurde dafür zunächst die mRNA aus den Zellen, bzw. Geweben isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch eine sich anschließende Standard-PCR mit gegenläufigen Primern, die ein ca.150-500 bp großes DNA-Sequenzstück innerhalb des

ORF (*Open Reading Frame*) des interessierenden Genes flankieren, kann so eine entsprechende Expression nachgewiesen werden. Für den semiquantitativen Expressionsvergleich erfolgte zunächst die Bestimmung der einzusetzenden cDNA-Konzentration mithilfe der ubiquitär exprimierten GAPDH unter Durchführung einer PCR mit GAPDH-Primern, bei welcher eine relativ geringe Zyklenzahl (15-22 Zyklen) zur Amplifizierung gewählt wurde, um minimale Konzentrations-Unterschiede erkennbar zu machen. Wiesen die verschiedenen Proben durch Einsatz entsprechender cDNA-Mengen gleiche GAPDH-Bandenintensitäten auf, wurden diese cDNA-Konzentrationen eingesetzt, um die Proben hinsichtlich der Expressionstärke des interessierenden Gens zu analysieren.

#### 2.4.1.4 Mutagenese-PCR

- Kit: Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase Kit (Finnzymes)
- Art der eingesetzten DNA: Plasmid-DNA
- Endvolumen: 100 µl

Um gezielt das Exon 6 des Pax6-Transkriptionsfaktors zu deletieren, wurde eine Mutagenese PCR nach Angaben des Mutagenese-PCR-Kit-Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie den zu deletierenden DNA-Abschnitt flankierten und den kompletten Vektor unter Ausschluss dieses Sequenzbereichs amplifizierten. Zur Gewährleistung des Ringschlusses des neu synthetisierten Plasmids, waren die Primer zudem am 5'-Ende phosphoryliert.

#### 2.4.2 Restriktionsverdau

Für die sequenzspezifische Hydrolyse der DNA wurden Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme von der Firma New England Biolabs verwendet, wobei die Durchführung nach den Richtlinien des Herstellers erfolgte.

#### 2.4.3 Agerosegel-Elektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agerosegelen

- TAE-Puffer 40 mM Tris  
20 mM Essigsäure

2 mM EDTA

→ pH 8,1

- Agarose

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke erfolgte die Auftrennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe, mittels horizontaler Gelelektrophorese. Zu diesem Zweck wurden 1 bis 1,5 %-ige Agerosegele verwendet, denen 0,05 µg/ml Ethidiumbromid pro ml TAE-Puffer zugefügt wurden. Dieses interkaliert mit der DNA und ermöglicht so eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht. Als Längenstandards dienten je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente die 100 bp oder 250 bp-DNA-Leiter von Roth. Wurde bei der PCR kein CoralLoad PCR-Puffer (Qiagen) verwendet, wurde die Probe vor der Auftragung mit Gel-Ladepuffer (Roth) versetzt, was im Verhältnis von 1:6 ( $V_{\text{Ladepuffer}}:V_{\text{DNA-Probe}}$ ) erfolgte. Zur Isolation eines gewünschten DNA-Fragmentes wurde dieses unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese Methode beruht auf der Auflösung des Agarose-DNA-Fragmentes in einem Hochsalzpuffer. Die DNA wird anschließend an eine Silica-Membran gebunden und schließlich durch leicht alkalische Niedrigsalzbedingungen eluiert

#### 2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren, wie der isolierten RNA oder DNA wurde mithilfe des Quant-iT™ –Assay Kit (Invitrogen) unter Verwendung eines Qubit-Fluorometers (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.4.5 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um die Religation eines linearisierten Plasmides zu unterbinden, wurde bei diesem spezifisch die 5'-terminale Phosphodiesterbindung durch Verwendung der alkalischen Phosphatase CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) hydrolysiert. Die eigentliche enzymatische Reaktion erfolgte bei 50°C für 5 min. Der dephosphorylierte Vektor wurde anschließend mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigt

#### 2.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines gewünschten DNA-Fragmentes in einen Expressionsvektor erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase (Quick Ligation Kit; New England Biolabs) nach den Angaben

des Herstellers. Dieses Enzym katalysiert die Phosphodiesterverknüpfungen zwischen der endständigen 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA.

#### 2.4.7 Transformation kompetenter Bakterien

- *E. coli* Stamm Subcloning Efficiency™DH5α™ (Invitrogen)
- LB-Flüssigmedium (selektiv)
- LB-Agarplatten (selektiv)

Zu 30 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 1-5 µl des Ligationsansatzes, bzw. 1-10 ng Plasmid-DNA gegeben und das Plasmid-Bakterien-Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 25 sec auf 42°C erhitzt, hernach sofort für 2 min in Eis gekühlt und dann 1 ml, mit entsprechendem Antibiotika versetzten LB-Flüssigmedium zugefügt und weitere 1,5 Stunden bei 37°C unter permanentem Schütteln (225 rpm) inkubiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension bei 6000 rpm für 2 min zentrifugiert, der Überstand weitestgehend verworfen, das Bakteriensediment in einem kleinen Restvolumen resuspendiert und auf einer Selektiv-LB-Agar-Platte ausgestrichen.

#### 2.4.8 Präparative Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine auf einer selektiven LB-Agarplatte gewachsene Bakterienkolonie wie unter 2.5.1 beschrieben in LB-Flüssigselektivmedium zur Vermehrung gebracht. Die Bakterien wurden anschließend pelletiert und weiter nach den Angaben des Produzenten des verwendeten Kits behandelt.

Zur schnellen Charakterisierung von Plasmiden wurden diese in kleinen Mengen isoliert, was unter Verwendung des Quicklyse Miniprep Kit der Firma Qiagen geschah. Zur Isolation größerer Mengen sehr reiner Plasmid-DNA wurde das Qiafilter Plasmid Midi Kit, ebenfalls von der Firma Qiagen, verwendet, wobei man sich zunächst auf das empfohlene Standardprotokoll des Herstellers bezog. Konnte auf diese Art nur eine inadäquate Ausbeute an Plasmid-DNA gewonnen werden, wurde eine Midi-Plasmid-Isolation nach dem Very-Low-Copy-Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 2.4.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten, bzw. vollständigen Sequenz konstruierter Plasmide wurden diese, wie auch bestimmte PCR-Amplifikate, unter Verwendung entsprechender Primer von der Firma Medigenomix sequenziert.

### 2.4.10 Glycerolstocks

Da Glycerol die Ausbildung von Eiskristallen verhindert, wurde dieses für die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen (*E.coli*), zur Anfertigung sogenannter Glycerolstocks verwendet. 750 µl einer bei 37°C über Nacht gewachsenen Kultur wurden zu diesem Zweck mit 150 µl einer sterilen 30 %-igen Glycerol-Lösung versetzt und unter gelegentlichem Invertieren für 2 Stunden bei Raumtemperatur und folgend noch 1 Stunde auf Eis inkubiert, bevor sie bei -80°C eingelagert wurde. Für das erneute Ausplattieren der Glycerolkultur reichte die oberflächliche Bakterientnahme, so dass der Stock nicht aufgetaut werden musste.

### 2.4.11 RNA-Isolation

Zum Zwecke der Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellkulturen (INS-1E), murinen Langerhans Inseln sowie aus dem kompletten embryonalen Mauspankreas wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Sowohl adhärente INS-1E-Zellen, isolierte Maus-Inseln (2.8.1) als auch präparierte Pankreata von Mausembryonen (2.8.2) wurden zunächst mit PBS gewaschen, sofort auf Eis gestellt und mit 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit) lysiert und anschließend laut den Angaben des Kit-Herstellers weiter bearbeitet.

### 2.4.12 Reverse Transkriptase Reaktion

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) durch die reverse Transkription der isolierten mRNA mittels reverser Transkriptase erfolgte unter Verwendung des ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei dienten Oligo-dT-Nukleotide, die an den polyadenylierten Schwanz der mRNA binden, als Primer.

## 2.5 Zellkulturelle Methoden

### 2.5.1 Kultivierung prokaryontischer Zellen

Die Kultivierung prokaryontischer Zellen aus einer Glycerindauerkultur sowie nach der Transformation fand auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz statt. Nach der Ausplattierung der Bakterien erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht in einem Bakterieninkubator, bzw. 2 Tage bei Raumtemperatur auf der Werkbank. Für die Durchführung einer Plasmidpräparation (2.4.8) erfolgte die Inokulation einer Bakterienkolonie in 3 ml entsprechendem LB-Flüssigselektivmedium mit anschließender Inkubation bei 37°C unter Schütteln bei 220 rpm. Fand eine Mini-Plasmidpräparation statt, betrug die Inkubationszeit 16 h. Sollte eine Midi- oder Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt werden, wurde zunächst für 8 h inkubiert. Anschließend wurde diese Bakterienkultur durch Übertragung von 50 µl in 50 ml, bzw. 250 µl in 250 ml frisches LB-Flüssigselektivmedium 1:1000 verdünnt und weitere 12-16 h bei 37°C und unter Schütteln inkubiert.

### 2.5.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

- INS-1E-Medium  
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, + Phenolrot)  
+ 5 % FCS  
+ 10 mM HEPES  
+ 1 mM Na-Pyruvat  
+ 100 IU/ml Penicillin  
+ 100 µg/ml Streptomycin  
+ 50 µM β-ME

Die Kultivierung adhärent wachsender eukaryontischer INS-1E-Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit unter sterilen Bedingungen in spezifischem INS-1E-Medium. Das Medium wurde alle 3 Tage ersetzt. Nach Erreichen der Konfluenz (5-7 Tage) wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und durch Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Nach Zugabe von INS-1E-Medium wurden die Zellen 3 min bei 1200 x g pelletiert, in INS-1E-Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:3 in neue Zellkulturschalen überführt. Sollten die Zellen für experimentelle Analysen eingesetzt werden, wurde vorab die Zellzahl bestimmt und die Zellen dann in einer für das Experiment ermittelten Verdünnung in entsprechende Zellkulturschalen ausgesät.

### 2.5.2.1 Bestimmung der Zellzahl

- Trypanblaulösung 1 % in 0,9 % NaCl

Für die Aussaat einer definierten Zelldichte wurde die Zellzahl bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben trypsinisiert, pelletiert und resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 100 µl mit 900 µl Trypanblaulösung vorsichtig vermischt, 1 min inkubiert und 10 µl dieser Lösung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellzählung erfolgte dann unter dem Mikroskop indem die Zellen zumeist von 4 Großquadraten ausgezählt wurden. Für die Berechnung der definitiven Zellzahl fand folgende Formel Anwendung:

$$\text{Anzahl Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Anzahl Quadrate} = \text{Zellzahl} \times 10^{-4} / \text{ml}$$

### 2.5.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von INS-1E-Zellen

- Einfriermedium INS-1E Medium  
+10 % DMSO

Für die Konservierung sowohl stabil transfizierter als auch nativer INS-1E-Zellen wurden diese durch Trypsinisation von der Zellkulturschale gelöst, nach entsprechendem Zentrifugationsvorgang in Einfriermedium auf Eis resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die aliquotierten Zellen schrittweise weiter herabgekühlt. Dazu wurden die Aliquots zunächst 2 Stunden bei -20°C inkubiert, anschließend 1 Tag in einer Styropor-Box bei -80°C belassen, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Das Auftauen von in flüssigem Stickstoff eingelagerten INS-1E-Zellen erfolgte zügig unter leichtem Schütteln bei 37°C im Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden dann mittels Pipette in ein Zellkulturröhrchen mit vorgelegtem INS-1E-Medium überführt, 3 min bei 1200 x g zentrifugiert, das erhaltene Pellet in INS-1E-Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Zellkulturschale ausgesät.

## 2.5.3 Transfektion von INS-1E-Zellen

### 2.5.3.1 Transiente Plasmid-DNA Transfektion an INS-1E-Zellen

Für die transiente Plasmid-DNA Transfektion der INS-1E-Zellen wurde die Methode der kationischen Lipofektion unter Verwendung des Transfektionsreagenz Roti® Fect Plus (Roth) gewählt. Bei dieser Methode binden Kationen die negativ geladene DNA und die

entstandenen Liposomen-DNA-Komplexe können dann mit der Zellmembran der zu transfizierenden Zellen fusionieren, so dass die zu transfizierende DNA in das Innere der Zelle gelangt und dort von den zelleigenen Mechanismen transkribiert und translatiert werden kann. Die Optimierung dieser Methode, hinsichtlich Zellzahl, einzusetzender Plasmid-DNA-Konzentration sowie dem Verhältnis von Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz erfolgte, unter Berücksichtigung der Herstellerangaben, mit dem Plasmid pEGFP-N1, welches die konstitutive Expression des GFP (Green Fluorescence Proteine) in den Zellen bewirkt. Entsprechende Informationen sind so einzig durch fluoreszenzmikroskopische Betrachtung zu gewinnen. So optimiert, wurden, falls nicht anders angegeben,  $1,5 \times 10^5$  Zellen/24-Well bzw.  $3 \times 10^5$  Zellen/6-Well ausgesät und innerhalb einer Stunde mit einem 1:3-Transfektionsgemisch, bestehend aus DNA in Antibiotika-freien INS-1E-Medium und Transfektionsreagenz, transfiziert. Im 24-Well-Maßstab wurden 2 µg und im 6-Well-Maßstab 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen eine dem Versuch entsprechende Zeit weiter inkubiert.

### 2.5.3.2 Generierung stabil mit Plasmid-DNA transfizierter INS-1E-Zellklone

Für die Generierung stabil transfizierter Zellen wurde ebenfalls die Methode der kationischen Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz Roti<sup>®</sup> Fect Plus gewählt. Um jedoch die stabile genomische Integration der zugesetzten DNA zu erleichtern, wurde das Plasmid mit dem interessierenden Gen (GOI; *Gene Of Interest*) zuvor durch enzymatischen Verdau außerhalb der GOI-Region linearisiert. Im 6-Well-Maßstab erfolgte dann die Aussaat von  $6 \times 10^5$  INS-1E-Zellen/Well. Zu diesen wurde innerhalb einer Stunde das Transfektionsgemisch, bestehend aus 6 µg entsprechender Plasmid-DNA und dem Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:3, zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Da das Ausgangsplasmid pcDNA3, bzw. das Plasmid pTet-Off-Advanced die Information für die Neomycinresistenz besitzt, wurde dem Medium von nun an zur klonalen Selektion G418, in einer vorab ermittelten Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Zellklone, die der Herstellung zur induzierbaren stabilen Überexpression dienen und bereits stabil mit dem pTet-Off-Advanced Plasmid transfiziert waren, erhielten von nun an Hygromycin in einer ebenfalls zuvor bestimmten Konzentration von 80 ng/µl. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen eines 6-Wells auf eine 15 cm Zellkulturplatte übertragen und bei 3-tägig stattfindenden Mediumwechsel inkubiert, bis eindeutig abgrenzbare Zellkolonien erkennbar waren. Zur Isolation einzelner Zellklone wurde das Medium von der Zellkulturplatte entfernt. Die Platte wurde hernach mit einem 1:1 Gemisch aus Low-Melt-Agarose und 2-fach konzentrierten Zellkulturmedium überschichtet und bis zur Polymerisation bei Raumtemperatur, bzw. bei

länger als 20 min andauerndem Polymerisationsvorgang bei 37°C, inkubiert. Durch Trypsinieren in aufgesetzten Cloning-Zylindern wurden einzelne Zellklone von der Zellkulturplatte abgelöst und in einem Well einer 24-Well-Platte zur Expansion gebracht. Nach Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurden diese dann in zwei Wells einer 24-Well-Platte gesplittet, wobei die Zellen eines dieser Wells zur weiteren Expansion des Zellklons bestimmt waren, während die Zellen des anderen Wells dem Screening hinsichtlich positiver stabiler Integration des GOI dienten. Für die stabile Transfektion zur konstitutiven Überexpression erfolgte dies durch eine rtPCR unter Verwendung eines entsprechenden Primerpaares. Die Zielsequenz des *Forward*-Primers lag dabei innerhalb der kodierenden Region des GOI, während der *Reverse*-Primer so gewählt wurde, dass er die das Stopp-Kodon des GOI flankierende Vektor-DNA hybridisierte. Für die stabile Transfektion zur induzierbaren Überexpression erfolgte das Screening hinsichtlich der stabilen tTA-Expression (*tetracycline-controlled TransActivator*) durch Immundetektion mittels TetR-Antikörper an der Westernblot-Membran.

Zusätzlich wurden bei jeder stabilen Transfektion Klone mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert.

### 2.5.3.3 Transiente siRNA-Transfektion an INS-1E-Zellen

Um die Expression endogenen Eny2-Proteins zu inhibieren, wurden transiente Transfektionen mit Eny2-spezifischer siRNA (Silencer select<sup>®</sup>; Ambion) unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofektamin RNAi MAX<sup>®</sup> (Invitrogen), nach dem reversen Transfektions-Protokoll des Herstellers, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden, sofern nicht anders aufgeführt,  $1,5 \times 10^{-5}$  frisch gesplittete INS-1E-Zellen/24-Well ausgesät. In diese Wells wurde zuvor eine Mischung aus kompletten INS-1E-Medium, welches jedoch keine Antibiotika enthielt, und Komplexen aus Kontroll- bzw. Eny2-spezifischer siRNA und Lipofektamin vorgelegt. Ohne weiteren Mediumwechsel wurden die Zellen für 3-4 Tage, bis zur Durchführung des Experiments, unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert.

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 Gewinnung von INS-1E-Zelllysaten

- Lysepuffer: 50 mM HEPES  
0,1 % Triton X-100  
1 mM DTT  
1x Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche)

Adhärente INS-1E-Zellen wurde zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde Lysispuffer hinzugefügt (150 µl / Well im 24-Well-Maßstab, 500 µl / Zellkulturplatte Ø 10 cm) und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Nach Transferieren der Zellsuspension in ein Eppendorfgesäß, einer 30-minütigen Lyse bei 4°C unter permanentem Schütteln sowie einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm und ebenfalls 4°C, wurde der klare Überstand als Zelllysate gewonnen und gegebenenfalls bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

### 2.6.2 Bestimmung des Proteingehalts in Zelllysaten

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) sowie das entsprechende Fluorometer (Qubit; Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Sammelgel
  - 4,5 % Acrylamid-Bisacrylamid
  - 125 mM Tris-HCl pH 6,8
  - 0,1 % SDS
  - 0,1 % APS
  - 0,1 % TEMED
- Trenngel
  - 10-15% Acrylamid-Bisacrylamid
  - 375 mM Tris-HCl pH 8,8
  - 0,1 % SDS
  - 0,05 % APS
  - 0,05 % TEMED
- SDS-PAGE-Laufpuffer
  - 192 mM Glycin
  - 25 mM Tris
  - 0,1 % SDS
- SDS-Probenpuffer 5x (reduzierend)
  - 10 % SDS
  - 500 mM DTT
  - 125 mM TRIS (pH 6,8)
  - 0,001 % Bromphenolblau
  - 50 % Glycerol

- SDS Probenpuffer 4x von Roth  
(nicht reduzierend)

Um Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-PAGE im diskontinuierlichen Laemmli-System (Laemmli, 1970) durchgeführt. Im Allgemeinen wurden hierbei 10-15 %ige Trenngele und 4,5 %ige Sammelgele verwendet. Vor dem Auftragen der Proteinproben auf das Gel wurden diese mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Das Gel wurde mit 25 µg Protein pro Spur beladen. Zusätzlich wurde zu den Proben ein Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein Standard dual color, Bio-Rad) auf das Gel aufgebracht. Die Laufzeit betrug 1-2 Stunden bei einer angelegten Spannung von 80-120 V.

#### 2.6.4 Western Blot

- Transferpuffer  
192 mM Glycin  
25 mM Tris  
20 % Methanol

Der Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte im Biorad Transfer Cell System im Tankblot-Verfahren. Die angelegte Spannung betrug 105 V bei einer Laufzeit von 1,5 h, wobei der Blot, wie nachfolgend aufgezeigt, geschichtet war und sowohl die Schwämme als auch Filterpapiere zuvor mit Transferpuffer durchtränkt wurden.

##### ***Kathode (-)***

Schwamm

Filterpapier

SDS-Polyacrylamidgel

PVDF-Membran

Filterpapier

Schwamm

##### ***Anode (+)***

#### 2.6.5 Immundetektion und „Stripping“ der PVDF-Membran

- Blocking-Puffer  
5 % Milchpulver  
100 mM NaCl  
10 mM Tris

- 0,1 % Tween20  
→ pH 7,2
- Waschpuffer
  - 100 mM NaCl
  - 10 mM Tris
  - 0,1 % Tween20
  - pH 7,2
- Antikörperinkubationslösung
  - 100 mM NaCl
  - 1 mM NaPO<sub>4</sub>
  - 0,2 % Tween20
  - 0,1 % BSA
  - pH 7,2
- Stripping-Puffer
  - 200 mM Glycin
  - 100 mM NaCl
  - pH 2,2

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit Blocking-Puffer. Anschließend wurde die Membran kurz mit Waschpuffer gewaschen und der primäre Antikörper verdünnt in Antikörperinkubationslösung aufgetragen und entweder für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten 3 5-minütige Waschschriffe mit Waschpuffer um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem Waschen wurde der entsprechende sekundäre Antikörper, gekoppelt an HRP (*Horse Raddish Peroxidase*), deren Verdünnung ebenfalls mit Antikörperinkubationslösung erfolgte, auf die PVDF-Membran aufgebracht und verblieb dort für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde abermals 3-malig für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Detektion des Antikörpers erfolgte. Dazu wurde die PVDF-Membran mit ECL (*Enhanced Chemi-Luminescence*, Thermo Scientific) inkubiert und die Chemiluminenszenz-Färbung auf Amersham Hyperfilm™ECL (GE Healthcare) dokumentiert.

Sollte die Membran zusätzlich zum ersten primären Antikörper mit einem weiteren primären Antikörper aus der gleichen Spezies inkubiert werden, wie beispielsweise nach dem HA-Tag-Antikörper mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin (beide in Maus generiert), erfolgte vor der zweiten Detektion zunächst das so genannte „Strippen“ der Membran. Dabei wird sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper von der Membran entfernt. Dies erfolgte, indem die PVDF-Membran nach erster Detektion kurz in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 Minuten in Methanol inkubiert wurde. Nachfolgend wurde die Membran

zweimal für eine Minute mit Aqua dest gewaschen, dann für 30 Sekunden in Stripping-Puffer inkubiert und nochmals 1-minütig mit Aqua dest gespült, bevor sich, wie bereits bei der ersten Detektion, erneut eine Inkubation mit Blocking-Puffer sowie die weiteren Schritte der Immundetektion anschlossen.

## 2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.7.1 Insulinsekretions-Assay und Bestimmung des Gesamt-Insulingehalts

- INS-1E-KRBH-Puffer
  - 135 mM NaCl
  - 3,6 mM KCl
  - 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 5 mM NaHCO<sub>3</sub>
  - 10 mM HEPES
  - 0,1 % BSA
  - pH 7,2

Für die Bestimmung der Insulinsekretion wurden Zellen grundsätzlich im 24-Well-Maßstab ausgesät. Nach einer Transfektionszeit von 72 Stunden für Überexpressionsexperimente, 72-96 Stunden für siRNA-vermittelte Suppression, bzw. nach Erreichen der Konfluenz für stabil transfizierte INS-1E Klone wurden die Zellen 2-mal mit je 0,5 ml KRBH-Puffer/Well gewaschen und 30 min bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte im Zellkultur-Brutschrank mit 1 ml KRBH-Puffer/Well vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen abermals mit 0,5 ml KRBH-Puffer/Well gewaschen und erneut 30 min im Zellkultur-Brutschrank mit 1ml KRBH-Puffer/Well inkubiert. Bei diesem Inkubationsschritt waren dem KRBH-Puffer jedoch Glukose in unterschiedlichen physiologischen Konzentrationen (2,8-16,7 mM) und entsprechend dem Experiment verschiedene Sekretagoga bzw. Inhibitoren zugesetzt (Diazoxid, Exendin-4, Forskolin, H-89, Tolbutamid, 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyladenosin-3',5'-cyclic Monophosphat, N6-Benzoyladenosen-3',5'-cyclic Monophosphat). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt, 500 µl Überstand abgenommen und bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert, um eventuell im Überstand befindliche Zellen zu entfernen. 300 µl dieses Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Insulinkonzentration bei -20°C gelagert. Um mögliche Differenzen hinsichtlich der Zelldichte zwischen den einzelnen Wells zu umgehen, wurde der Gehalt des sezernierten Insulins auf den Proteingehalt normalisiert. Zu diesem Zweck wurde der in den Wells der Zellkulturplatte verbliebene KRBH-Puffer von den Zellen abgesaugt, die



### 2.7.3 Bestimmung der Proliferation / Vitalität mittels MTT-Test

Da das MTT-Reagenz von lebenden Zellen aufgenommen und durch die oben beschriebenen (3.7.2) Mechanismen umgesetzt wird, sind mittels Durchführung eines MTT-Test's Aussagen über die Vitalität möglich.

Ohne Durchführung eines Mediumwechsels wurden dem Medium transfizierter INS-1E-Zellen (500µl), nach einer entsprechenden Transfektionszeit, 50 µl einer MTT-Stammlösung beigefügt. Nach einem Inkubationsschritt von 1,5 Stunden bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank wurde die Medium-MTT-Lösung abgenommen und verworfen, 550 µl Isopropanol / 10 % DMSO-Lösung zu den Zellen gegeben und für 5 min bei 37°C zum Herauslösen der Formazankristalle inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Bestimmung der Absorption des entstandenen Formazan bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch vermessen.

### 2.7.4 Bestimmung des sich formierten cAMP mittels cAMP-Assay

Für die Messung gebildeten cAMP's wurde das Medium transfizierter, im 24-Well-Maßstab ausgesäeter INS-1E-Zellen nach einer entsprechenden Transfektionszeit entfernt, die Zellen 2-mal mit vorgewärmten INS-1E-KRBH-Puffer gewaschen und im gleichen Puffer für 30 min, bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank vorinkubiert. Danach wurden die Zellen abermals gewaschen und in 0,5 ml vorgewärmten INS-1E-KRBH-Puffer, versetzt mit 16,7 mM Glukose, mit oder ohne Exendin-4 unterschiedlicher Konzentration sowie mit oder ohne 100 µM IBMX, inkubiert. Nach 3-15 min wurde der Überstand von den Zellen entfernt und das entstandene cAMP durch sofortige Zugabe von 0,1 mol/l HCl / 0,5 % Triton X-100 zu den Zellen extrahiert. Nach Transferieren des Extrakts in ein Reaktionsgefäß und einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (600 x g, 10 min), wurde die cAMP-Konzentration im Überstand mittels kompetitiven cAMP-ELISA-Kits nach dem Protokoll des Produzenten (Thermo Scientific) analysiert.

### 2.7.5 Bestimmung des intrazellulären Kalziums

- Fura-2-AM (Calbiochem) 2 µM in INS-1E-KRBH-Puffer

Um Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von INS-1E-Zellen aufzuzeichnen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM) gewählt. Dabei handelt es sich um einen Kalzium-Chelator, welcher im nahen UV-Bereich absorbiert und überdies aufgrund der Acetoxy-methylreste gut membranpermeabel ist. Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes stellt eine Funktion der Kalzium-Konzentration dar, die

von einer Reihe, zum Teil unbekannter Faktoren abhängig ist. Da Fura-2 jedoch in der Kalzium-gebundenen Form mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bei der Anregungs-Wellenlänge 340 nm und gleichzeitig mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität bei der Anregungs-Wellenlänge 380 nm reagiert, ist es möglich zwei Fluoreszenzmessungen kurz hintereinander durchzuführen und über die Ratio-Bildung viele der unbekanntenen Größen zu eliminieren. Durch diese Methode eröffnet sich die Möglichkeit, in lebenden Zellen die Kalziumkonzentration, bzw. deren Veränderung zu ermitteln.

Für die Bestimmung des intrazellulären Kalziums in INS-1E-Zellen wurden diese auf Gelatine-beschichtete Deckgläschen, im 24-Well-Maßstab transfiziert und ausgesät. Nach entsprechender Transfektionszeit wurden die Zellen mit INS-1E-KRBH-Puffer gewaschen und für 30 min bei 37°C mit 2 µM Fura-2-AM beladen. Anschließend wurden die Zellen abermals mit KRBH gewaschen und mit 400 µl KRBH überschichtet in die Messapparatur, ein DMIRB Inversionsmikroskop (T.I.L.L. Photonics), ausgestattet mit einem Temperaturregelten Mikroskopschlitten sowie einem 40x/1,30 Öl-Immersionsobjektiv (Zeiss), eingebracht. Die Registrierung der Fluoreszenzsignale erfolgte, nach dem Passieren eines dichroitischen Spiegel und eines 520 nm Bandpassfilters, mit einer gekühlten CCD-Kamera. Für die Bedienung des gesamten Kalzium-Imaging-Systems sowie zum Aufzeichnen und Bearbeiten der Daten wurde das Programm Vision 2.06 (T.I.L.L. Photonics) verwendet.

Nach dem Einbringen der Zellen in das Versuchssystem wurde zunächst die Basislinie der Fluoreszenzsignale der Zellen in Glukose-freien KRBH-Puffer aufgenommen. Die Veränderung der Versuchsbedingungen erfolgte dahingehend, dass 200 µl des KRBH von den Zellen vorsichtig abgenommen und sofort durch 200 µl KRBH mit entsprechendem Zusatz ersetzt und entsprechende Zeit inkubiert wurden. Über die Dauer des gesamten Versuches wurden dabei für die beiden Exzitations-Wellenlängen (340 und 380 nm) 20 Bilder in der Minute aufgezeichnet. Auf einem dieser Bilder wurden nach Versuchsende mindestens 15 einzelne Zellen als einzelne Flächenelemente, so genannte ROI (*Region Of Interest*), festgelegt und von diesen für jedes Einzelbild der aufgenommenen Bildsequenz die mittlere Emissions- (Fluoreszenz-) Intensität nach Hintergrund-Subtraktion bestimmt. Anschließend wurde der Quotient dieser Intensitäten bei den beiden Anregungs-Wellenlängen ermittelt und über die Zeit aufgetragen.

## 2.8 Tierexperimentelles Arbeiten

### 2.8.1 Isolation Langerhansscher Inseln

- Kollagenase-Lösung  
Hank's BSS  
+ 10 mM HEPES  
+ 0,1 % BSA

- Isolations-Medium
  - + 1 mg/ml Collagenase V
  - Hank's BSS
  - + 10 mM HEPES
  - + 10 % FCS

Für die Isolation muriner Langerhansscher Inseln wurde die Maus durch Inhalation steigender Isofluran-Konzentrationen anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurde der Bauchraum eröffnet und zum Ausbluten lassen des Tieres eines der großen Abdominal-Gefäße durchtrennt. Das Hepar wurde nach cranial geklappt und mit einem Ethanol-getränkten Tupfer fixiert. Die nachfolgenden Schritte wurden dann bei stereomikroskopischer Betrachtung ausgeführt. Zunächst wurde der Ductus pancreaticus unmittelbar vor der Papilla duodeni major mittels kleiner Gefäßklemme abgeklemmt. Anschließend wurden 3 ml eiskalte Kollagenase-Lösung, unter Verwendung einer Spritze mit 30G-Injektionskanüle über den Ductus choledochus in das Pankreas injiziert. Das aufgespritzte Organ wurde vorsichtig aus dem Abdomen präpariert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml vorgelegter, eiskalter Kollagenase-Lösung überführt. Um den Organverdau zu starten, wurde das Reaktionsgefäß bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß hin und wieder kräftig per Hand geschüttelt wurde, um die Zerkleinerung des Gewebes zu unterstützen. Nach 5-8 min wurde damit begonnen, den Verdau mikroskopisch zu kontrollieren. Sobald sich Langerhans Inseln frei von exokrinem Pankreasgewebe erkennen ließen, wurde der Collagenase-Verdau durch Zugabe von 45 ml eiskalten Isolations-Mediums und sofortigem 2-maligen Invertieren des Reaktionsgefäßes gestoppt. Es folgte die Zentrifugation bei 800 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25 ml Isolations-Medium resuspendiert und abermals bei 800 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrattes wurde das Pellet schließlich in 15 ml Isolation-Medium aufgenommen und die Inseln unter einem Stereomikroskop, mittels ausgezogener Glas-Pasteurpipette isoliert.

### **2.8.2 Präparation muriner embryonaler Pankreata am Schwangerschaftstag E 18,5**

- Avertin
  - 122 mg Tribromoethanol
  - 245 µl 2-Methyl-2-Butanol
  - ad Aqua dest. 10 ml

Nach dem Zusammenbringen weiblicher und männlicher Tiere wurden am Folgemorgen eine Verpaarung und damit eine mögliche Schwangerschaft anhand eines vorhandenen

Vaginalpfropfes beim weiblichen Tier festgestellt. Dabei handelt es sich um koagulierte Proteine der männlichen Samenflüssigkeit, die nach Kopulation für annähernd 12 Stunden bei der weiblichen Maus vorzufinden sind. Dieser Zeitpunkt wurde dann als Schwangerschaftstag E 0,5 festgelegt. Am 18,5-ten Tag der Trächtigkeit (E 18,5) wurde das Muttertier durch intraperitoneale Injektion von Avertin, was gleichzeitig zur Betäubung der Embryonen führt, anästhesiert und durch anschließende cervikale Dislokation getötet. Danach wurde der Bauchraum des trächtigen Weibchens eröffnet, der paarig angelegte, Embryonen-beinhaltende Uterus entfernt und aus diesem die Embryonen herauspräpariert. Unter dem Stereomikroskop, in einer mit PBS gefüllten Petrischale, erfolgte schließlich die Präparation der embryonalen Pankreata, indem der Embryo sowohl unterhalb des Thorax als auch oberhalb des Pelvis durchtrennt wurde und das Pankreas bis auf die Milz von allen umgebenden Geweben isoliert wurde.

### **2.8.3 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)**

Nach Bestimmung des Körpergewichtes wurde von sich seit 6 Stunden in Nahrungskarenz befindenden Mäusen durch Anritzen des Schwanzes, welcher zuvor mittels eines lokalen Anästhetikums (Emla-Salbe) betäubt wurde, Blut aus der Schwanzvene, sowohl zur Bestimmung des Nüchtern-Blutzuckers, als auch zur Ermittlung des Plasma-Insulins, entnommen ( $t_0$ ). Dem Tier wurden anschließend 2 Milligramm Glukose pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert, worauf nach 15, 30, 60 und 120 min abermals Blutentnahmen zur Messung der Blutglukose-Konzentration sowie zur Bestimmung des Plasma-Insulins erfolgten.

### **2.8.4 Bestimmung der Blutglukose-Konzentration**

Die Messung der Blutglukose erfolgte mittels eines Blutzuckermessgerätes (Ascensia CONTOUR®; Bayer ) nebst dazugehöriger Teststreifen nach Angaben des Herstellers.

### **2.8.5 Bestimmung des Plasma-Insulins**

Zur Bestimmung des Plasma-Insulins wurde eine Mindestmenge von 20  $\mu$ l Blut mit einer Di-Kalium-EDTA-Mikrovette (Sarstedt) aufgefangen. Nach einem Zentrifugationschritt (3000 rpm, 3 min) wurden mindestens 5  $\mu$ l des Blutplasma-Überstandes abgenommen und bis zum Gebrauch bei -20°C konserviert. Die Bestimmung des Plasma-Insulins erfolgte dann mit dem Ultra sensitive mouse Insulin ELISA Kit (Crystal Chem. Inc.) nach Herstellerangaben.

### 2.8.6 Bestimmung der $\alpha$ - und $\beta$ -Zellmasse

Für die Bestimmung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellmasse wurde das Gewicht des Pankreas sofort nach der Entnahme bestimmt und das Organ, wie nachfolgend (2.9.1) für Paraffinschnitte beschrieben, für die weitere mikroskopische Auswertung aufgearbeitet.

Die Auswertung erfolgte dann anhand entsprechend markierter Gewebeschnitte mithilfe einer Okular-Gitter-Vorlage, welche mit 10 x 10 im Quadrat angeordneten Kleinquadraten 121 Kreuzungspunkte umfasste. Von mindestens 120 betrachteten Gesichtsfeldern pro Gewebeschnitt wurden jeweils die Kreuzungspunkte ausgezählt, welche sich über pankreatischem ( $P_P$ ), nicht-pankretischem ( $P_A$ ) sowie über Glukagon- ( $P_\alpha$ ), bzw. insulinpositiven ( $P_\beta$ ) Gewebs-Arealen befanden. Unter zu Hilfenahme folgender Formel wurde anschließend die  $\alpha$ -, bzw.  $\beta$ -Zellmasse bestimmt:

**$\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Zellmasse (mg/g Körpergewicht) =**

$$\frac{(\sum P_\alpha \text{ bzw. } P_\beta / (\sum P_P + \sum P_A + \sum P_\alpha \text{ bzw. } P_\beta)) \times \text{Pankreasgewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}}$$

## 2.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

### 2.9.1 Immunfluoreszenzmarkierungen an Gewebsschnitten

Für Immunfluoreszenzmarkierungen an Gefrierschnitten wurde entnommenes embryonales Pankreasgewebe zunächst 10 min in 4 % PFA in PBS fixiert, anschließend für jeweils eine Stunde erst in 15 %- und dann in 30 %-iger Sucroslösung (in PBS) inkubiert und schließlich in Tissue Tek OCT eingebettet. Mittels Gefriermikrotom wurden von diesem Gewebe 4  $\mu$ m starke Schnitte angefertigt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Schnitte wurden diese kurz in PBS gewaschen und nachfolgend, zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen, für 1 Stunde in 1 % Normal-Esel-Serum sowie zur Permeabilisierung mit 0,1 % des nicht-ionischen Detergens Triton-X-100 (in PBS) blockiert. Nachfolgend fand die Inkubation des primären, bzw. im Falle von Doppelmarkierungen einer Mischung der beiden primären Antikörper in PBS bei 4°C über Nacht statt. Nach dreimaligem Waschvorgang mit PBS erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten (Cy2, bzw. Cy3) Antikörpern bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Gewebsschnitte wurden danach abermals dreimal in PBS gewaschen und abschließend zur Visualisierung der Zellkerne für 5 min mit DAPI, bzw. TOPRO inkubiert und unter Verwendung von Mounting Medium als Enddeckmittel mit einem Deckglas abgedeckt.

Für die Herstellung immunfluoreszenz-markierter Paraffinschnitte wurde entnommenes Gewebe 24 Stunden in 4 %-iger PFA-Lösung (in PBS) fixiert, in Paraffin eingebettet und

mittels Mikrotom in Schnitte ebenfalls der Stärke 4  $\mu\text{m}$  geschnitten, welche bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur verblieben. Durch eine zweimalige 10-minütige Inkubation mit Xylol wurden die Gewebsschnitte entparaffiniert und in einer sich anschließenden absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dann erfolgte eine Behandlung der Gewebsschnitte mit 0,01 M Na-Citrat (in PBS) im Dampfdruckgerät für 30 min, um antigene Determinanten zu demaskieren. Die nachfolgenden Schritte, wie das Blockieren, die Inkubation der primären und sekundären Antikörper, als auch die Kernvisualisierungen sowie das Eindecken wurden entsprechend, wie für Immunmarkierungen an Gefrierschnitten beschrieben, durchgeführt.

### 2.9.2 Immunfluoreszenzmarkierungen an Zellkulturen

Für Immunfluoreszenzmarkierungen an Zellkulturen wurden die Zellen auf Gelatinebeschichtete Deckgläser ausgesät und entsprechend behandelt. Nach versuchsgemäßer Wachstumsdauer wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und kurz mit PBS gespült, bevor die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA-Lösung (in PBS) erfolgte. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min wurden die Deckgläser dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und ebenfalls, wie oben am Gewebeschnitten beschrieben, blockiert, mit primären und sekundären Antikörper inkubiert, die Zellkerne mit DAPI, bzw. TOPRO markiert und das Zellpräparat eingedeckt.

Abweichend von diesem Markierungsprotokoll erfolgte im Falle der Markierung des Aktins-Zytoskeletts, nach der Fixierung und dem Waschen der Zellen, die Inkubation mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 546-konjugiertem Phalloidin für 20 min. Die Deckgläser wurden anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen, die Zellkerne mit DAPI markiert und das Präparat mit Mounting Medium eingedeckt.

## 2.10 Statistische Analyse

Die Auswertung sowie die Darstellung erhaltener Daten erfolgte mit den Programmen Exel<sup>®</sup> 2010 und Sigma Plot 8.0. Die aufgezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung (SD, *Standard Deviation*) von mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test, sofern zwei experimentelle Bedingungen miteinander verglichen wurden. Bei einem Vergleich von 3 oder mehr Versuchsbedingungen erfolgte die statistische Analyse über die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis Of Variance*) mit nachfolgendem Post-hoc-Test (Bonferroni-Korrektur). Unterschiede wurden als signifikant gewertet bei einem Wert von  $P < 0,05$ .

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rolle der verschiedenen Pax6 Domänen für die Differenzierung des endokrinen Pankreas

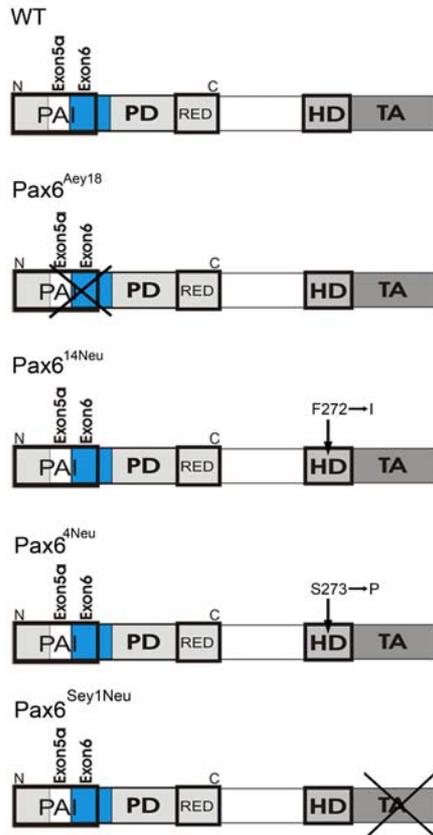
Der Transkriptionsfaktor Pax6 ist wesentlich für die Entwicklung verschiedenster Organe, einschließlich des endokrinen Pankreas. Dort ist Pax6 bedeutend für die Zellzahl, die Morphologie, aber auch für die Expression verschiedener Insel-Hormone. Ein Pax6-Knockout zieht einen Verlust der Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen sowie eine verminderte  $\beta$ -Zellzahl, als auch eine desorganisierte Inselstruktur nach sich (St-Onge et al., 1997).

Neben einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA) besitzt Pax6 zwei DNA-bindende Domänen, eine Paired-Domäne (PD) und eine Homöodomäne (HD). Die spezifische Rolle dieser drei Domänen für die Entwicklung des endokrinen Pankreas war bisher unklar. Gegenstand des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war daher der Bedeutung der drei Hauptdomänen von Pax6 für die Ausbildung der pankreatischen Inselzellen nachzugehen.

Für die Analyse der Funktion der verschiedenen Pax6-Domänen bei der Differenzierung endokriner Pankreaszellen standen uns 4 Mauslinien zur Verfügung, die Mutationen in einer dieser Domänen aufwiesen (Abb. 3.1).

Um die funktionelle Rolle der PD von Pax6 zu untersuchen, verwendeten wir die Pankreata homozygoter Tiere der Linie Pax6<sup>Aey18</sup>. Ein Nukleotidaustausch am 3'-Ende des Intron 5a führt bei dieser Mauslinie, zu einer Veränderung der entsprechenden Splicestelle, was ein Fehlen von sowohl Exon 5a als auch Exon 6 zur Konsequenz hat (Graw et al., 2005). Durch diese Deletion wird eine Bindung der Ziel-DNA über die PAI-Subdomäne der PD verhindert (Graw et al., 2005). Der Rest des Pax6-Proteins bleibt hingegen intakt. Die Mauslinien Pax<sup>4Neu</sup> und Pax6<sup>132-14Neu</sup> (Pax6<sup>14Neu</sup>) wurden genutzt, um die Rolle der HD zu analysieren. Beide Linien weisen je eine Punktmutation im Pax6-Gen auf, wodurch es zu einem Austausch benachbarter Aminosäuren in der dritten Helix der Homöodomäne des Pax6-Proteins kommt, was die DNA-Bindung via HD unterbindet (Favor et al., 2008; Favor et al., 2001). Bei der Mauslinie Pax6<sup>Sey-Neu</sup> sind dagegen die beiden DNA-Bindedomänen intakt, jedoch ist bei diesen Mutanten das Pax6-Protein um die TA trunkiert.

Ähnlich den Pax6-Knockout Mäusen (Pax6<sup>-/-</sup>) versterben homozygote Träger der Pax6<sup>Aey18</sup>-, der Pax6<sup>Sey-Neu</sup> sowie der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation innerhalb kurzer Zeit nach der Geburt, ein Umstand der es erforderlich machte, embryonales Pankreasgewebe (E18,5) dieser Tiere zu analysieren. Tiere mit homozygoter Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation hingegen erreichen das Erwachsenenalter und sind zudem fertil.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der funktionalen Pax6 Domänen und ihrer Modifizierung bei den verwendeten Mauslinien.**

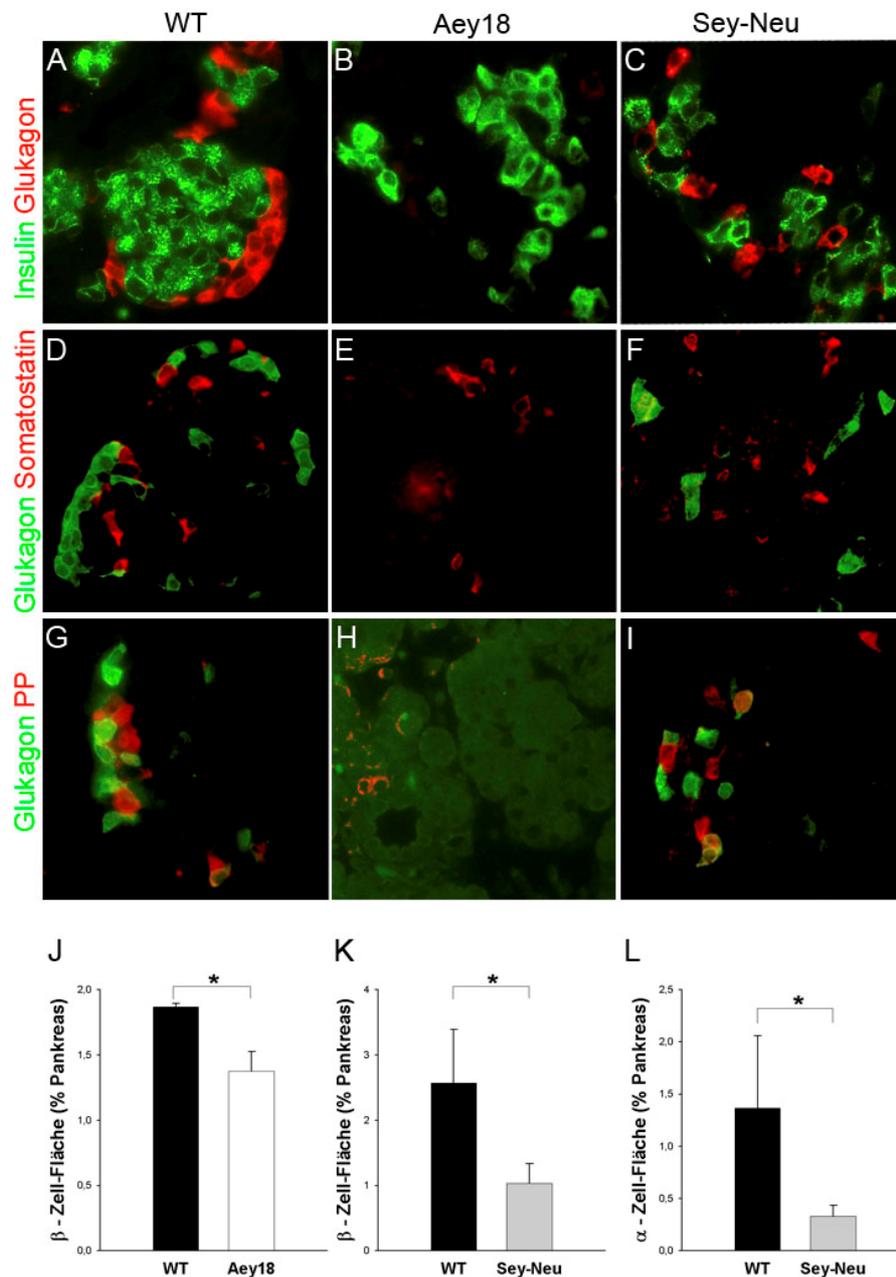
Die Mauslinie Pax6<sup>Aey18</sup> zeigt eine Deletion in der Paired-Domäne. Hier fehlen sowohl Exon 5a als auch Exon 6. Die Mauslinien Pax6<sup>4Neu</sup> und Pax6<sup>14Neu</sup> weisen jeweils einen Aminosäureaustausch in der Homöodomäne auf, was die DNA-Bindung über diese Domäne beeinflusst. Bei der Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mauslinie fehlt die Transaktivierungsdomäne des Pax6-Proteins. PD, Paired-Domäne; HD, Homöodomäne; TA, Transaktivierungsdomäne; PAI und RED, N- und C-terminale DNA-bindende Subdomäne der PD.

### 3.1.1 Einfluss der Paired-Domäne sowie der Transaktivierungsdomäne von Pax6 auf die Ausbildung endokriner Zellen

Zur Analyse des Einflusses der Paired-Domäne sowie der Transaktivierungsdomäne auf die Differenzierung pankreatischer Inselzellen, wurden Gewebsschnitte von in Paraffin eingebetteten embryonalen Pankreata homozygoter Pax6<sup>Aey18</sup> bzw. Pax6<sup>Sey-Neu</sup> Mäuse gefertigt. Diese wurden in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zum einen gegen Glukagon und zum anderen mit einem Antikörper gegen eines der anderen Inselzellhormone markiert und mit entsprechenden Gewebsschnitten von Wildtypmäusen (WT) verglichen. Überdies erfolgte anhand der Gewebsschnitte mit Doppel-Markierung gegen Glukagon und Insulin die quantitative Bestimmung des  $\alpha$ - sowie des  $\beta$ -Zellanteils relativ zur Gesamtpankreasfläche.

Wie der morphologische Vergleich gegenüber dem WT erkennen lässt (Abb. 3.2), zeigen Tiere mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation einen ähnlichen Pankreasphänotyp wie Pax6<sup>-/-</sup>-Knockout-Tiere. Es kommt zu einem fast kompletten Verlust glukagonpositiver  $\alpha$ -Zellen (Abb. 3.2 B). Lediglich mit dem sensitivsten von drei getesteten Antikörpern gegen Glukagon ließen sich durchschnittlich 0-4 schwach glukagonpositive Zellen pro Schnitt detektieren. Die quantitative Auswertung der  $\beta$ -Zellfläche ergab, dass diese Mutation ebenfalls eine Reduktion insulinpositiver Zellen zur Folge hat. Dies äußerte sich in einer gegenüber dem

Wildtyp signifikant um 26 % verminderten insulinpositiven Zellfläche (Abb. 3.2 J;  $p=0,01$  vs. WT). Darüber hinaus, analog zu einem Pax6<sup>-/-</sup>-Knockout, erschien die Inselstruktur ungeordnet.



**Abb. 3.2: Die Paired-Domäne von Pax6 spielt bei der Ausdifferenzierung glukagonpositiver Zellen eine größere Rolle als die Transaktivierungsdomäne.**

A-I) Detektion insulin-, glukagon-, somatostatin- und PP-positiver Zellen an Pankreas-Gewebsschnitten von Mausembryonen (E18,5) des Wildtyps bzw. mit homozygoter Pax6-Mutation (wie angegeben). Während der Pankreasphänotyp der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten ein fast vollständiges Fehlen glukagonpositiver  $\alpha$ -Zellen induziert, ist diese Inselzellpopulation, mit einem Anteil von 25 % gegenüber dem des Wildtyps, bei Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mutanten jedoch vertreten. Beide Mutationen haben eine deutliche Abnahme insulinpositiver  $\beta$ -Zellen als auch eine ungeordnete Inselmorphologie zur Folge. Während die Zahl der somatostatinpositiven Zellen sowohl von der PD als auch der TA von Pax6 unbeeinträchtigt ist, führt eine Inaktivierung der PD im Gegensatz zur TA zu einer scheinbaren Reduktion der PP-Zellen. J-L) Quantitative Bestimmung der insulin- und glukagonpositiven Zellfläche in Relation zur Gesamtpankreas-Fläche. WT=Wildtyp; PP=pankreatisches Polypeptid. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 3-5 ausgewerteten Mäusen pro Gruppe. \* $p < 0,05$ .

Die fluoreszenz-mikroskopische Betrachtung glukagon- und somatostatinmarkierter Gewebsschnitte lässt vermuten, dass Pax6, bzw. die PD von Pax6, keinen Einfluss auf die Ausprägung somatostatinpositiver  $\delta$ -Zellen hat. Die Zahl dieses Inselzelltyps erscheint gegenüber der des Wildtyps unverändert (Abb. 3.2 E). PP-Zellen hingegen ließen sich nur in einer geringeren Anzahl detektieren (Abb. 3.2 H), womit die PD für die Ausbildung einer korrekten PP-Zellzahl wichtig erscheint. Da jedoch weder der  $\delta$ - noch der PP-Zellanteil quantifiziert wurde, ist zu erwähnen, dass dies nur Rückschlüsse basierend auf rein visueller Beobachtung sind.

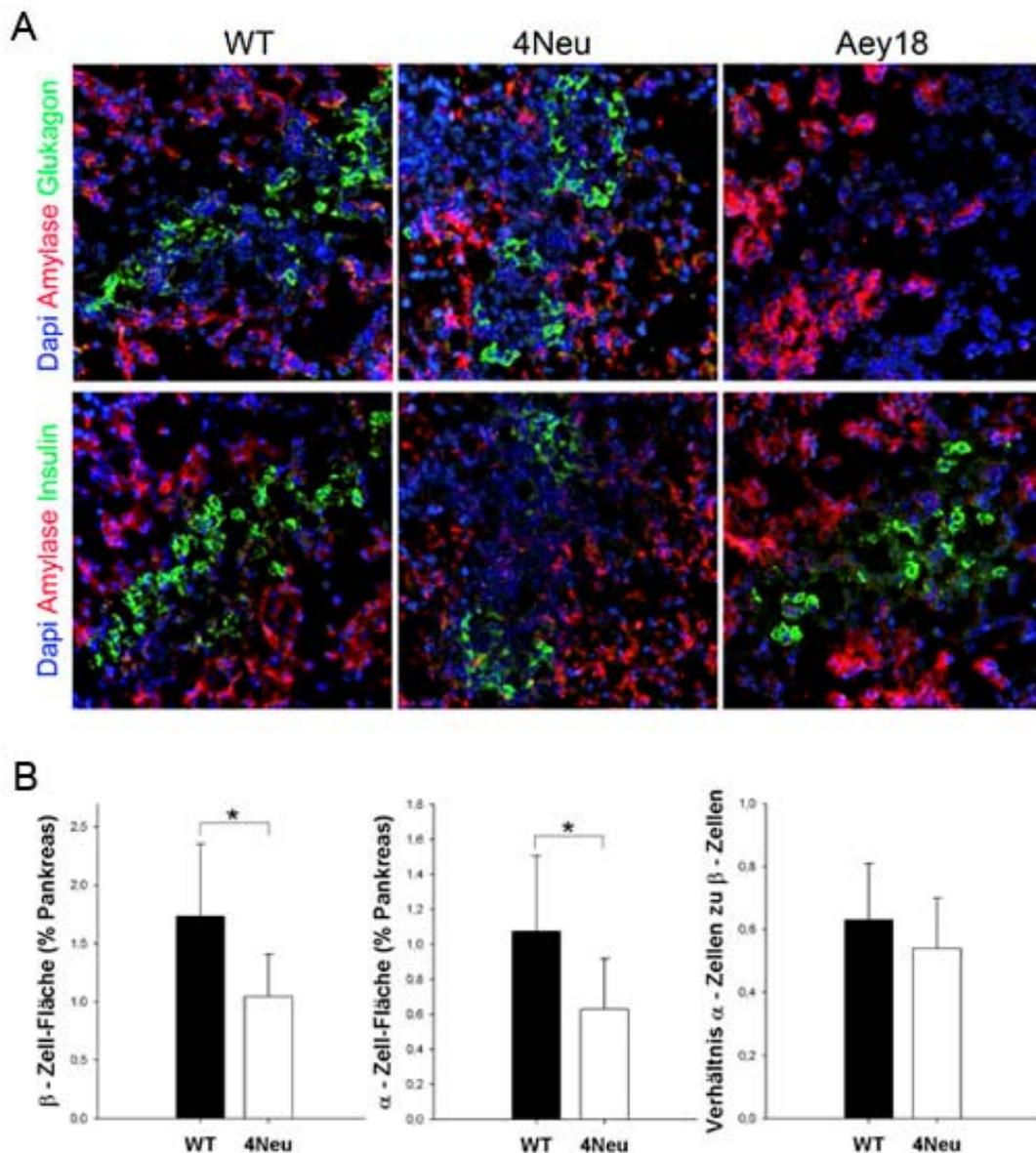
Aus der Literatur ist bekannt, dass der Verlust der TA von Pax6 ( $\text{Pax6}^{\text{Sey-Neu}}$ ) einen endokrinen Pankreasphänotyp aufweist, der durch eine Reduktion der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, und PP-Zellzahl sowie einer desorganisierten Inselstruktur gekennzeichnet ist (Sander et al., 1997). Unsere Auswertungen der Pankreata homozygoter  $\text{Pax6}^{\text{Sey-Neu}}$ -Embryonen bestätigen im Wesentlichen diesen von Sander et al. beschriebenen Phänotyp. Auch wir konnten eine anormale Inselarchitektur (Abb.3.2 C,F,I) mit deutlich verminderter Zahl sowohl glukagonpositiver  $\alpha$ - (C, L in Abb. 3.2) als auch insulinpositiver  $\beta$ -Zellen (C, K in Abb. 3.2) feststellen. Ein Vergleich mit den Wildtyp-Kontrollen ergab eine Verringerung glukagonproduzierender  $\alpha$ -Zellen um 75 % ( $p=0,011$ ). Insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen waren um 60 % reduziert ( $p=0,004$ ). Die somatostatinpositiven  $\delta$ - und PP-positiven Zellen hingegen, scheinen unbeeinflusst von der  $\text{Pax6}^{\text{Sey-Neu}}$ -Mutation (F, I in Abb. 3.2), allerdings fand unsererseits keine genaue Quantifizierung dieser Zellpopulationen statt. Hinsichtlich der Zellgröße und -morphologie zeigten sich gegenüber dem WT, weder durch die  $\text{Pax6}^{\text{Aey18}}$ - noch durch die  $\text{Pax6}^{\text{Sey-Neu}}$ -Mutation, erkennbare Differenzen.

### 3.1.2 Einfluss der Homöodomäne von Pax6 auf die Ausbildung endokriner Zellen

Um die Rolle der Homöodomäne von Pax6 zu untersuchen, standen uns zwei Mauslinien,  $\text{Pax6}^{4\text{Neu}}$  und  $\text{Pax}^{14\text{Neu}}$ , zur Verfügung, die, wie oben beschrieben, an benachbarten Stellen des Pax6-Proteins einen Aminosäureaustausch aufweisen.

Die Analyse der  $\text{Pax6}^{4\text{Neu}}$ -Mutanten erfolgte dabei in einem Zeitabschnitt dieser Arbeit, als noch kein Zugang zu einem Mikrotom für Paraffinschnitte bestand. Die Auswertung dieser Homöodomänen-Mutation wurde daher ausschließlich an Gefrierschnitten getätigt.

Gefrierschnitte des Pankreas entsprechender Embryonen wurden zu diesem Zweck mit Antikörpern gegen Glukagon bzw. Insulin und, zur eindeutigeren Abgrenzung endo- und exokriner Pankreasanteile, mit einem Antikörper gegen Amylase markiert. Die Visualisierung der Kerne erfolgte mittels Dapi.



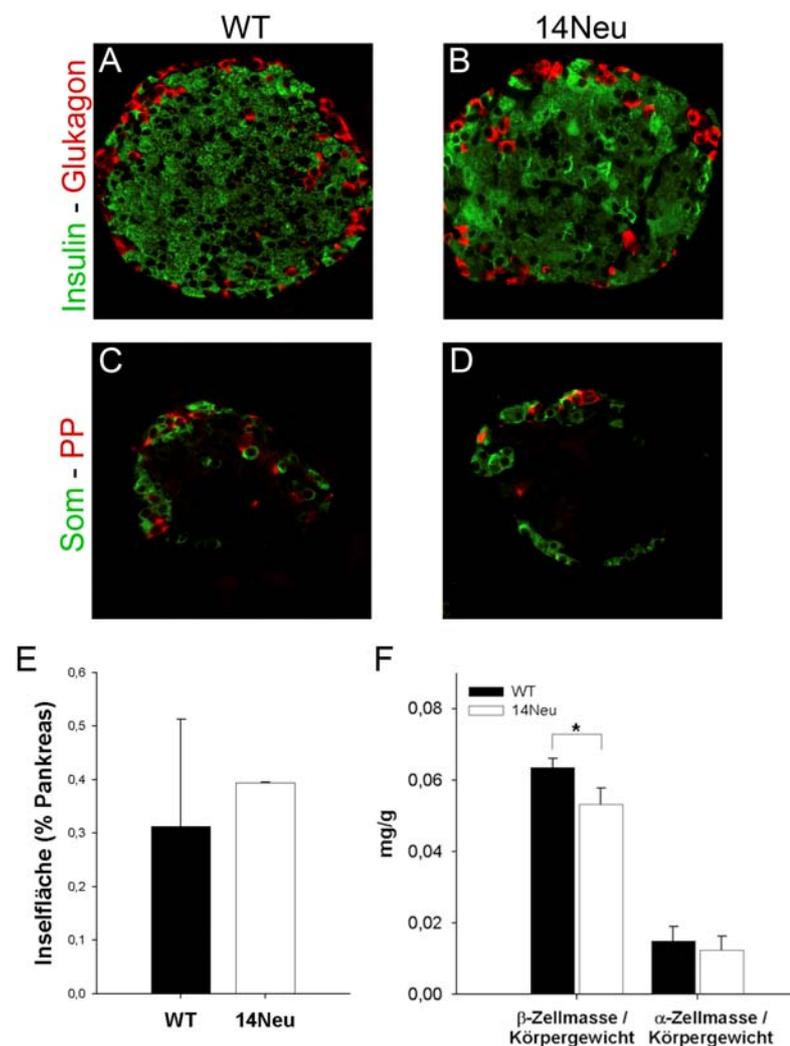
**Abb. 3.3: Die Pax6<sup>4Neu</sup> Homöodomänen-Mutation zeigt einen Pankreasphänotyp mit reduziertem  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Zellanteil.**

A) Immunmarkierung embryonaler pankreatischer Gefrierschnitte des Wildtyps und angegebener Pax6-Mutanten. Während die Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation einen Verlust glukagonpositiver Zellen zur Folge hat, war dieser Inselzelltyp bei Mutanten, welche die Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation tragen präsent. B) Die Quantifizierung glukagon- und insulinpositiver  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Zellanteile in Bezug zum Gesamtpankreas zeigte jedoch, dass beide Zellpopulationen durch die Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation signifikant vermindert in ihrer Zahl auftreten. WT=Wildtyp. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 6-7 ausgewerteten Mäusen pro Gruppe. \* $p < 0,05$ .

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zum Vergleich sind Gefrierschnitte der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation mit aufgeführt, zeigt der Pankreas-Phänotyp homozygoter Pax6<sup>4Neu</sup>-Tiere, dass sich die HD von Pax6 für die Entwicklung der Inselzellpopulation nicht so dominierend wie die PD auswirkt. Neben insulinpositiven  $\beta$ -Zellen ließen sich, im Gegensatz zur Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation, eindeutig glukagonproduzierende  $\alpha$ -Zellen nachweisen. Die Quantifizierung dieser Zellpopulationen ergab jedoch für beide Zelllinien eine signifikante Reduktion gegenüber

dem Wildtyp, was eine Homöodomänen-Abhängigkeit der finalen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellzahl indiziert. Der glukagonproduzierende  $\alpha$ -Zellanteil zeigte sich infolge der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation um 41 % ( $p=0,04$  vs. WT) und der insulinproduzierende  $\beta$ -Zellanteil um 39 % ( $p=0,03$  vs. WT) verringert. Das Verhältnis dieser beiden Inselzelltypen zueinander, wird durch diese Mutation jedoch nicht beeinflusst.

Die anhand der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation gewonnenen Ergebnisse, wonach der HD von Pax6 bei der Differenzierung endokriner Pankreaszellen eher eine untergeordnete Rolle beizumessen ist, werden durch die Analyse der anderen Homöodomänen-Mutation (Pax6<sup>14Neu</sup>) unterstützt.



**Abb. 3.4:** Die Pax6<sup>14Neu</sup> Homöodomänen-Mutation zeigt einen Pankreasphänotyp, der sich nur in der  $\beta$ -Zellmasse von dem Pankreasphänotyp des Wildtyps unterscheidet.

A-D) Immunmarkierung embryonaler pankreatischer Paraffinschnitte von WT und Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutanten. Morphologisch zeigten sich im Vergleich mit dem Wildtyp bei der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation keine offenkundigen Abweichungen. E-F) Auch die Quantifizierung der Inselgröße und  $\alpha$ -Zellmasse erbrachte keine Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Hinsichtlich der  $\beta$ -Zellmasse konnte jedoch eine signifikante Reduktion bei den Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutanten gemessen werden. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 3-6 Mäusen/Gruppe. \* $p<0,05$ . WT=Wildtyp; Som=Somatostatin; PP=pankreatisches Polypeptid.

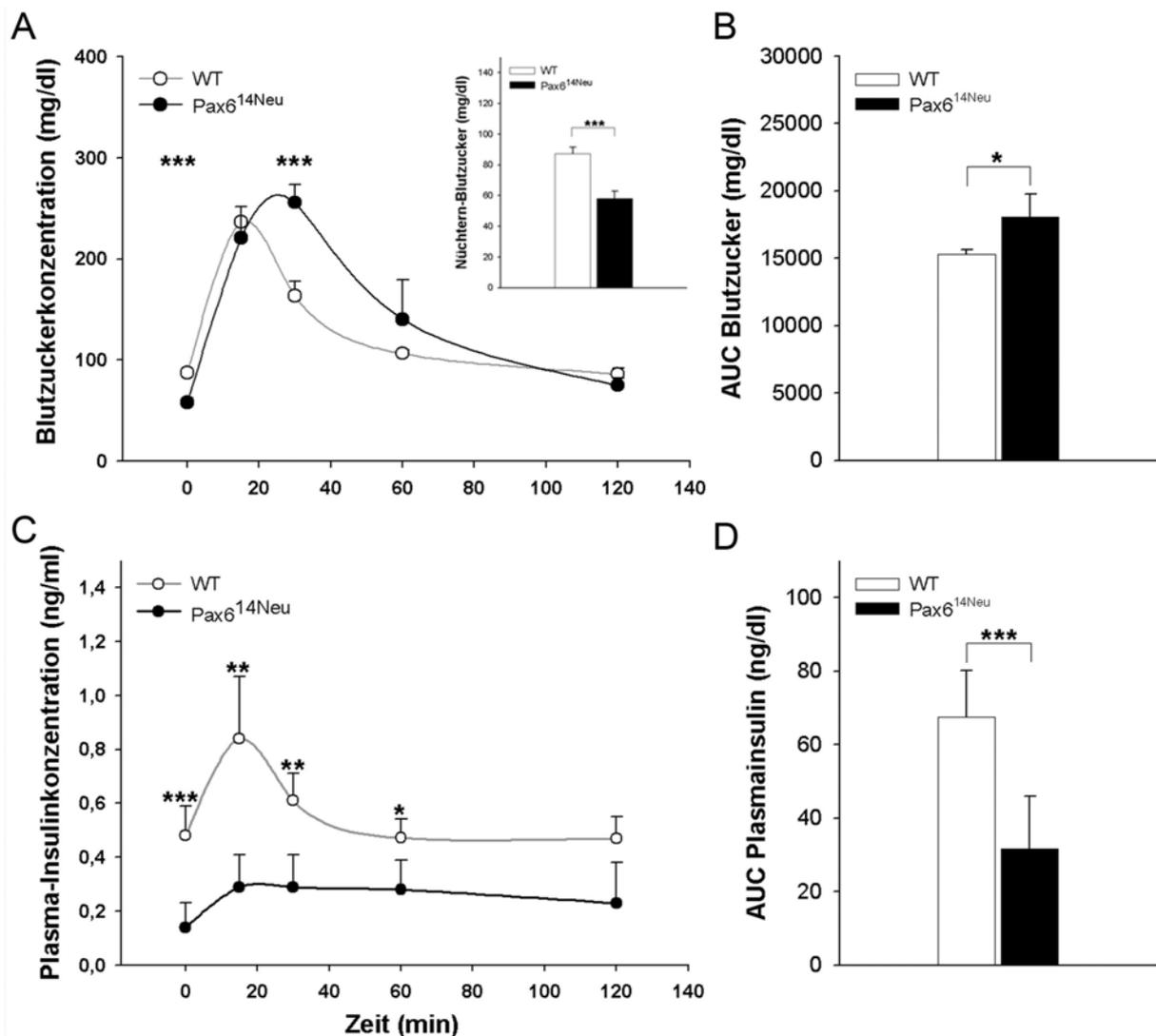
Obgleich es bei der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation zu einem Austausch einer Aminosäure kommt, welche unmittelbar an die Aminosäure grenzt, die bei der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation substituiert wird, erreichen Tiere, die homozygot diese Mutation tragen, das Adult-Stadium. Dies ermöglichte es uns den Pankreasphänotyp dieser Mutation an 6 Wochen alten Mäusen zu untersuchen. Wie durch die Abbildung 3.4 wiedergegeben, waren morphologisch keine Unterschiede im Pankreas-Phänotyp der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation und des Wildtyps erkennbar. Gleich der Wildtyp-Kontrolle zeigen die Langerhansinseln eine für Nagetiere typische Architektur, mit im Zentrum befindlichen insulinpositiven  $\beta$ -Zellen, umschlossen von den anderen Inselzell-Populationen (A-D in Abb. 3.4). Das Diagramm E der Abbildung 3.4 zeigt zudem, dass auch die Größe der pankreatischen Inseln nicht durch die Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation beeinflusst wird. Hingegen ergab die Quantifizierung der  $\beta$ -Zellmasse gegenüber dem Wildtyp eine deutliche Verringerung in Pax6<sup>14Neu</sup>-Individuen (WT:  $0,064 \pm 0,0025$  mg/g vs. 14Neu:  $0,053 \pm 0,0047$  mg/g;  $p=0,02$ ), während sich die  $\alpha$ -Zellmasse statistisch unverändert zeigte (WT:  $0,015 \pm 0,004$  mg/g vs. 14Neu:  $0,012 \pm 0,004$  mg/g;  $p=0,44$ ).

### 3.1.2.1 Einfluss der Homöodomänen-Mutation Pax6<sup>14Neu</sup> auf die Glukosetoleranz

Um der Frage nachzugehen, ob sich der Pax6<sup>14Neu</sup>-Pankreasphänotyp, welcher eine verminderte  $\beta$ -Zellmasse zeigt, auch auf die Hormonproduktion, bzw. Sekretion und damit auf die physiologische Funktion des endokrinen Pankreas, die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase, auswirkt, wurden intraperitoneale Glukose-Toleranztestes (ipGTT), parallel zur Ermittlung der Plasmainsulinkonzentration durchgeführt. Dafür wurden 6 Wochen alten Mäusen, sowohl vom Wildtyp als auch mit Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation, nach einer Nahrungskarenz von 6 Stunden, Blut aus der Schwanzvene entnommen. Anschließend wurde ihnen eine Glukoselösung (2 g Glukose / kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert und nachfolgend nach 15, 30, 60 und 120 min erneut Blut zu Bestimmung der entsprechenden Parameter entnommen. Die graphische Darstellung dieses Versuchs zeigt Abbildung 3.5.

Im nüchternem Zustand zeigten Tiere, welche die Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation tragen, gegenüber dem Wildtyp signifikant erniedrigte Blutzuckerwerte (A und Insertion in A; WT:  $87,3 \pm 4,2$  mg/dl vs. Pax6<sup>14Neu</sup>:  $58,2 \pm 4,6$  mg/dl;  $n=3-6$  Tiere/Gruppe;  $p=0,00008$ ), was angesichts der verminderten  $\beta$ -Zellmasse überraschend ist. Innerhalb der ersten 15 min nach Glukose-Injektion kam es in beiden Populationen zu einem ähnlichen Anstieg des Blutzuckerspiegels (A in Abb. 3.5). Während dieser 30 min nach Verabreichung der Glukose bei Wildtyptieren bereits rückläufig war, wiesen Tiere mit der Homöodomänen-Mutation von Pax6 bis zu dieser Zeit noch eine Zunahme ihres Blutzuckerwertes auf (WT:  $163,7 \pm 14,4$  mg/dl vs. Pax6<sup>14Neu</sup>:  $255,8 \pm 17,6$  mg/dl;  $p=0,0002$ ). Erst ab diesem Zeitpunkt kam es dann auch in dieser Gruppe

zu einem kontinuierlichen Absinken der Blutglukosekonzentration, wobei diese jedoch erst nach cirka 120 min Kontroll-Niveau erreichte. Wie die Berechnung der AUC (*Area Under Curve*; B in Abb. 3.5) wiedergibt, zeichnen sich somit bei Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutanten nach Glukose-Injektion insgesamt erhöhte Blutzuckergerhalte ab (WT: 15277 ± 332 mg/dl vs. Pax6<sup>14Neu</sup>: 18062 ± 1670 mg/dl; p=0,03), was, wie Abb. 3.5 C und D aufzeigt, die Konsequenz deutlich verminderter Plasmainsulinkonzentrationen ist (AUC WT: 67,4 ± 12,7 ng/dl vs. AUC Pax6<sup>14Neu</sup>: 31,6 ± 14,3 ng/dl; p=0,008). Zudem fällt bei Betrachtung des Plasma-insulinspiegels auch auf, dass dieser bei Pax<sup>14Neu</sup>-Mutanten nach Glukoseinjektion keinen so deutlichen Anstieg aufwies, wie ihn der Wildtyp zeigte (C in Abb. 3.5). Diese verminderte Ausschüttung von Insulin innerhalb der ersten 15 Minuten nach Glukoseinjektion, deutet auf einen Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion hin, ähnlich wie es für den Typ 2 Diabetes mellitus postuliert ist (Efendic et al., 1988).



**Abb. 3.5: Infolge der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation zeigt sich, neben einer Glukoseintoleranz und erniedrigtem Plasmainsulinpiegel, ein signifikant erniedrigter Nüchtern-Blutzucker.**

Wildtyp- und Pax6<sup>14Neu</sup>-Mäusen wurde nach einer 6-stündigen Nahrungskarenz Blut zur Bestimmung des Nüchtern-Blutzuckers und Plasma-Insulins entnommen. Anschließend erfolgte eine intraperitoneale Glukoseinjektion mit nachfolgender Blutentnahme nach 15, 30, 60 und 120 min zur Bestimmung der entsprechenden Größen. A) Blutzuckerkonzentration während des ipGTT. Die Insertion zeigt zur Veranschaulichung den Nüchternblutzucker. C) Mittels entsprechendem ELISA bestimmte Plasma-Insulinkonzentrationen. B und C) Ermittelte AUC der Blutzucker- bzw. Plasmainsulinkurve. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. n=3-5 Tiere pro Gruppe. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 3.1.3 Einfluss der beiden DNA-bindenden Domänen von Pax6 auf die Differenzierung pankreatischer $\epsilon$ -Zellen

Heller et al. konnten eine antagonistische Rolle von Pax6 bei der Ausdifferenzierung pankreatischer  $\alpha$ - und ghrelinproduzierender  $\epsilon$ -Zellen feststellen (Heller et al., 2005). Sie untersuchten die Pankreata Pax6-defizienter Mausembryonen, deren Pax6 um die HD und TA trunziert war (Pax6<sup>Sey</sup>). Diese Mutation zeigt einen Pankreasphänotyp der bei gleichzeitiger Reduktion der glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen eine Expansion ghrelinproduzierender Zellen aufweist.

Für uns stellte sich daher die Frage, ob das für die Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation festgestellte, fast vollständige Fehlen glukagonpositiver  $\alpha$ -Zellen, bzw. die Reduktion des  $\alpha$ -Zellanteils im Zuge der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation, ebenfalls mit der Zunahme ghrelinpositiver Zellen einhergeht.

Wie die fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen ghrelin- und glukagonmarkierter Gefrierschnitte erkennen lassen (A in Abb. 3.6), führt die Inaktivierung der PD von Pax6 zu einer deutlichen Zunahme ghrelinpositiver Zellen. Eine diesbezügliche Veränderung konnte bei Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutanten hingegen, gegenüber den Wildtyp-Kontrollen, nicht festgestellt werden.

Heller et al. (2005) beschreiben neben dem Auftreten glukagon- und ghrelin-koexprimierender Zellen auch Zellen, die einzig das Hormon Ghrelin produzieren und daher eine eigene Subpopulation endokriner Pankreas-Zellen, die  $\epsilon$ -Zellen, darstellen (Prado et al., 2004). Entgegen dem Wildtyp und der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation (Pfeile in A von Abb. 3.6) konnten Glukagon-Ghrelin-positive Zellen bei Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten nicht nachgewiesen werden. Die ghrelinpositiven Zellen im Pankreasphänotyp der Pax<sup>Aey18</sup>-Mutation wurden von uns daher als  $\epsilon$ -zellen gewertet.

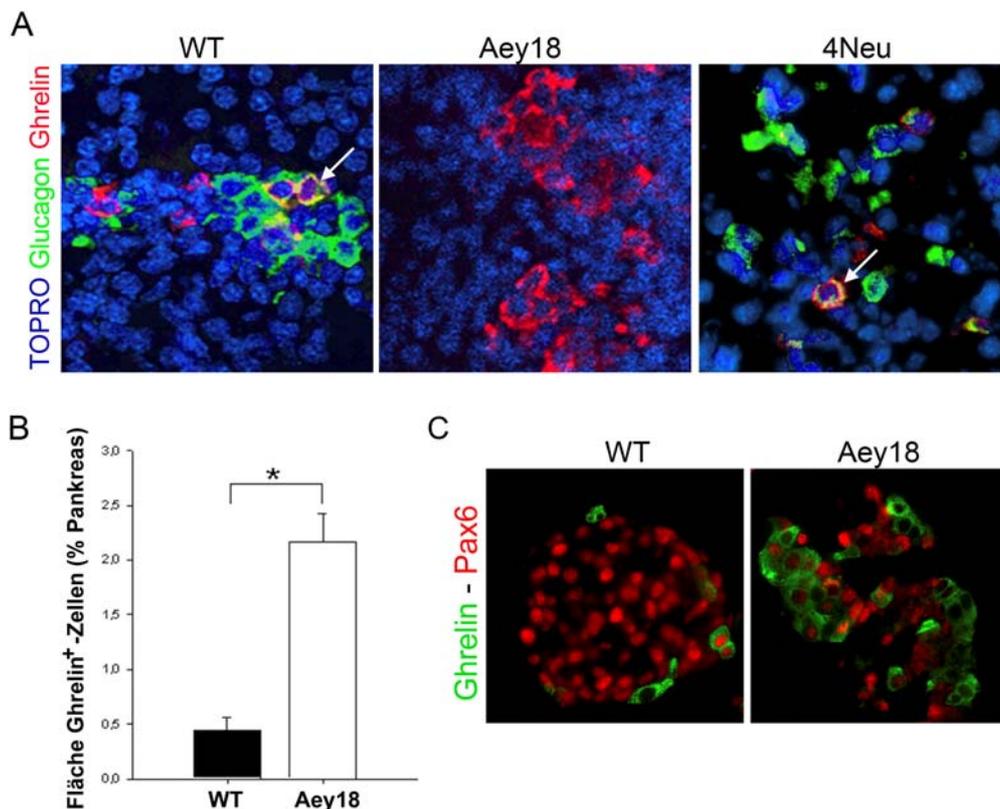
Die Bestimmung des ghrelinpositiven Zellanteils an Pankreas-Gewebsschnitten von Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten ergab, im Bezug zum Wildtyp, einen 5-fach erhöhten Wert (B in Abb. 3.6), wobei die Quantifizierung ungeachtet der Glukagon-Expression erfolgte.

Der Zuwachs an ghrelinproduzierenden Zellen entspricht dabei annähernd der Reduzierung des  $\alpha$ -Zellanteils, den wir als Konsequenz der Mutation der PD von Pax6 ermittelten. Dies

lässt am ehesten den Rückschluss zu, dass Pax6 bei normaler Ausprägung der  $\alpha$ -Zellen, die Entwicklung pankreatischer  $\epsilon$ -Zellen unterdrückt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ghrelin- und Pax6-markierter Gewebsschnitte der Abbildung 3.6 C zeigen zum einen, dass das Pax6-Protein bei der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation exprimiert wird und zum anderen, dass ghrelinpositive Zellen, sowohl bei Wildtyp-Tieren als auch bei Tieren mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation, in ihrer Expression des Pax6-Proteins variieren. Neben Pax6-koexprimierenden ghrelinpositiven Zellen treten ebenfalls Pax6-defiziente ghrelinpositive  $\epsilon$ -Zellen auf. Ein großer Teil Pax6-positiver Zellen trägt jedoch keine Ghrelin-Markierung und ist daher einer der anderen Inselzell-Population zuzuschreiben.

Darüber hinaus fällt bei der genaueren Betrachtung der zellulären Pax6-Lokalisation in der Abbildung 3.6 C eine gegenüber dem Wildtyp diffusere Verteilung des Pax6-Proteins in der Zelle auf.



**Abb. 3.6: Im Zuge der PD-Mutation von Pax6 kommt es zur Expansion ghrelinproduzierender  $\epsilon$ -Zellen.**

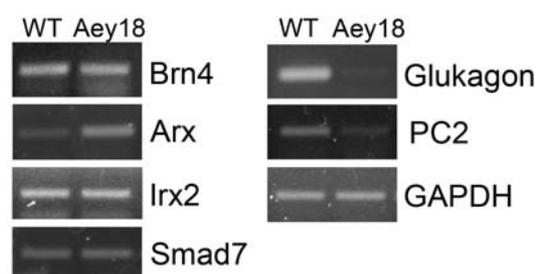
A) Immunmarkierung an embryonalen pankreatischen Gefrierschnitten des Wildtyps, mit Mutation der PD (Pax6<sup>Aey18</sup>) und mit Mutation der HD (Pax6<sup>4Neu</sup>). Das Pankreas von Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten zeigt eine Expansion ghrelinpositiver Zellen, während glukagonpositive Zellen nicht detektierbar sind. In Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutanten sind sowohl glukagonpositive  $\alpha$ -Zellen als auch ghrelinpositive Zellen präsent. Letztere scheinen in ähnlicher Zahl wie beim WT vertreten zu sein. Sowohl beim WT als auch bei Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutanten ko-exprimieren einige Zellen sowohl Glukagon als auch Ghrelin (Pfeile). B) Ungeachtet der Glukagon-Expression ergab die Quantifizierung des ghrelinpositiven Zellanteils eine signifikante Steigerung der  $\epsilon$ -Zellen im Zuge der PD-Mutation von Pax6. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD von 3 Mäusen / Gruppe. \* $p < 0,05$ . C) Pax6- und Ghrelin-Markierung an Paraffinschnitten des Pankreas vom WT und mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation. Ghrelinpositive Zellen variieren in ihrer Pax6-Expression, sowohl beim WT als auch bei Tieren mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation. WT=Wildtyp

### 3.1.4 Einfluss der Paired-Domäne von Pax6 auf die Expression anderer $\alpha$ -zellspezifischen Gene

Die oben aufgeführten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die PD bei der Differenzierung endokriner Pankreaszellen gegenüber den anderen Domänen von Pax6, vor allem der glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen, eine übergeordnete Rolle spielt. Während sowohl die Pax6<sup>14Neu-</sup>, die Pax6<sup>4Neu-</sup>- als auch die Pax6<sup>Sey-Neu-</sup>-Mutation eindeutig Pankreasphänotypen mit glukagonpositiven  $\alpha$ -Zellen zeigen, ist dieser Zelltyp im Pankreas der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten nahezu fehlend. Es stellt sich die Frage, ob es wirklich zu einem Verlust dieses Zelltyps kommt oder ob durch einen in der PD mutierten Pax6-Transkriptionsfaktor lediglich die Expression des zellspezifischen Hormons, in einer ansonsten ausdifferenzierten Zelle, verhindert wird. Mittels rtPCR führten wir daher Expressionanalysen anderer relativ  $\alpha$ -Zellspezifischer Gene durch. Neben Glukagon untersuchten wir die Expression der Prohormonkonvertase 2 (PC2), die außer in  $\alpha$ -Zellen, wo sie für die Konversion des Proglukagons zum fertigen Glukagon bedeutend ist (Rouille et al., 1994), auch in pankreatischen  $\beta$  und  $\delta$ -Zellen exprimiert wird (Guest et al., 2002; Malide et al., 1995). Mit Smad7, welches bei Überexpression die Expansion von  $\alpha$ -Zellen fördert (Smart et al., 2006), Brn4, Arx und Irx2 analysierten wir zudem noch weitere spezifische  $\alpha$ -Zellgene (Collombat et al., 2003; Heller et al., 2004; Hussain et al., 1997; Petri et al., 2006).

Wie das Ergebnis dieser Analysen verdeutlicht (Abb. 3.7), kommt es neben der erwarteten Suppression von Glukagon ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der PC2-Expression. Arx hingegen zeigt eine Erhöhung der Expression, während das Expressionsniveau von Brn4, Irx2 sowie Smad7 unverändert bleibt.

Diese Resultate zusammen mit den unter 3.1.3 aufgeführten Ergebnissen, wonach sich als Konsequenz der Mutation der PD von Pax6 (Pax6<sup>Aey18</sup>) eine signifikante Expansion ghrelinpositiver  $\epsilon$ -Zellen zeigt, deuten darauf hin, dass Pax6 neben der Transkription des Proglukagons noch für andere  $\alpha$ -Zell-spezifische Entwicklungsvorgänge bedeutsam ist, welche jedoch relativ spät in der  $\alpha$ -Zelldifferenzierung, oberhalb von Brn4 und Irx2 stattfinden.



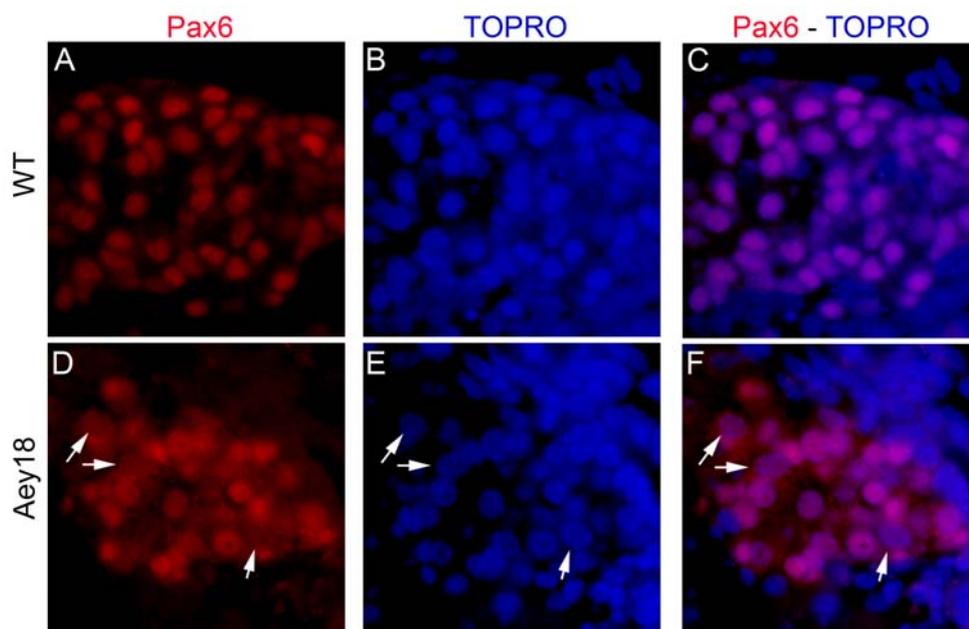
**Abb. 3.7: Expressionsanalyse putativer  $\alpha$ -Zell-spezifischer Gene.**

Mittels semiquantitativer rtPCR, mit entsprechenden Primern und der mRNA aus dem isolierten Pankreas von WT- und Pax6<sup>Aey18</sup>-Mausembryonen, führten wir Expressionsanalysen  $\alpha$ -Zell-spezifischer Gene durch. GAPDH diente zur Quantifizierung der einzusetzenden cDNA-Menge. Wie erwartet, ist die Expression des Glukagons aber auch die der Prohormonkonvertase 2 (PC2) vermindert, während Brn4, Irx2 und Smad7 gegenüber dem WT keine Veränderung der Expression zeigten. Die Expression von Arx hingegen zeigte sich erhöht. WT=Wildtyp.

**3.1.5 Einfluss der Paired-Domäne von Pax6 auf die zelluläre Lokalisation des Pax6-Proteins**

Wie bereits die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Pax6-markierter Gewebsschnitte der Abbildung 3.6 zeigten, führt die Mutation der PD von Pax6 zu einer nicht mehr so eindeutig nukleären Lokalisation des Pax6-Proteins. Um diesen Umstand genauer zu analysieren, wurden Gewebsschnitte vom embryonalen Pankreasgewebe von Wildtyp-Tieren sowie Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten mit einem Antikörper gegen Pax6 und zur Kerndarstellung mit TOPRO markiert. Das Ergebnis dieser Markierung ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Während der Wildtyp einen Pankreasphänotyp mit ausschließlich nukleärer Lokalisation von Pax6 aufwies, variierte die zelluläre Verteilung dieses Transkriptionsfaktors im Pankreas der Tiere mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation. Hier zeigten sich, neben Zellen mit eindeutig nukleärer Lokalisation, Zellen bei denen das Pax6-Protein mehrheitlich auf das Zytoplasma beschränkt war und auch Zellen, die sowohl eine Pax6-Markierung des Kerns als auch des Zytoplasmas trugen (Pfeile in Abb. 3.8).

Eine ähnliche Beobachtung konnte auch von Götz et al. (unveröffentlichte Ergebnisse) im Vorderhirn bei Tieren mit der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation festgestellt werden.



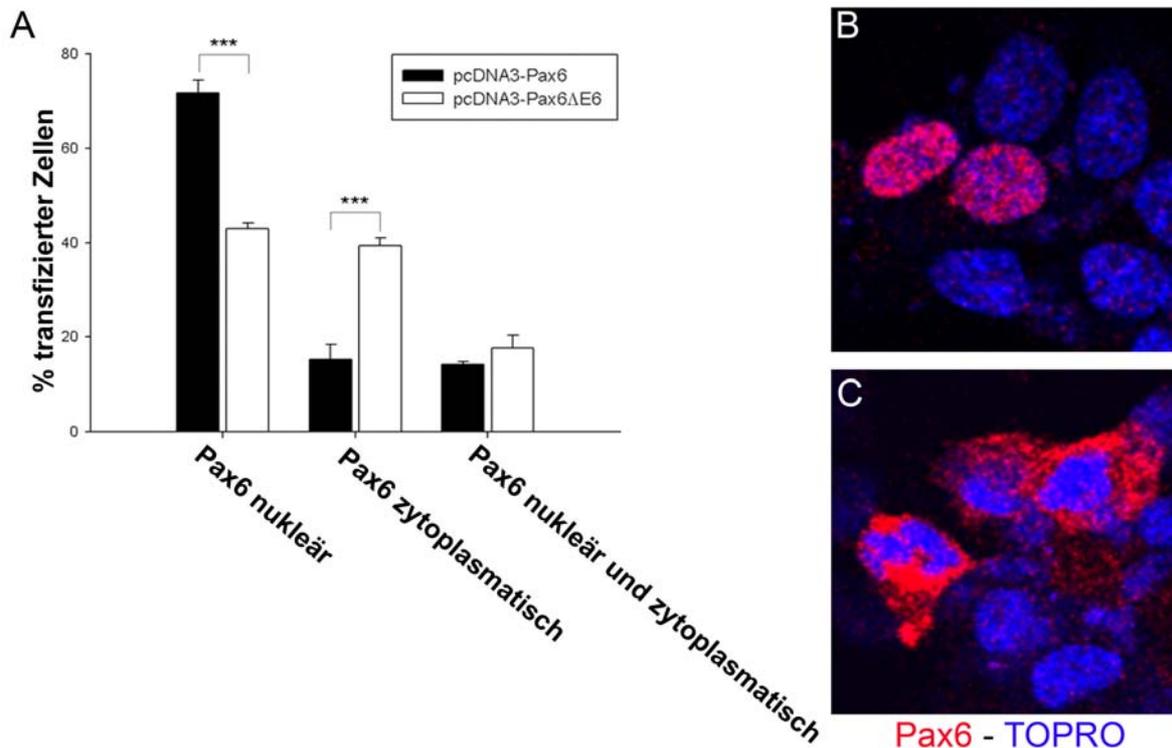
---

**Abb. 3.8: Eine Mutation der PD von Pax6 (Pax6<sup>Aey18</sup>) führt zu Veränderungen in der zellulären Verteilung des Transkriptionsfaktors.**

Embryonale Pankreasschnitte vom WT und Tieren mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation wurden Pax6-markiert. Zur Visualisierung der Kerne diente TOPRO. Im Vergleich mit dem WT zeigte der Pankreasphänotyp der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation, neben nukleär lokalisiertem Pax6-Protein, auch Inselzellen mit ausschließlich zytoplasmatisch oder zytoplasmatisch und im Kern auftretendem Pax6-Protein (Pfeile).

Exon 5a ist als gewebsspezifische Spleißvariante von Pax6 nicht immer im Pax6-Protein integriert. Daher war es unsere Annahme, dass Exon 6 eventuell eine Erkennungssequenz zur nukleären Lokalisation des Pax6-Proteins enthält (NLS, *nuklear localisation signal*). Ein Verlust dieser Sequenz, wie sie infolge der Deletion des Exon 6 bei der Pax<sup>Aey18</sup>-Mutation auftritt, würde demnach zu einer Anreicherung des Proteins im Zytoplasma führen. Die computergestützte Analyse der Pax6-Sequenz mit dem PSORT II Algorithmus konnte jedoch keine NLS in der PD des Pax6-Proteins identifizieren. Um unsere Hypothese zu stützen führten wir *in vitro* Experimente durch. Zu diesem Zweck wurde mittels Mutagenese-PCR das Exon 6 der kanonischen Pax6-Form, welche zuvor in den pcDNA3-Expressionsvektor kloniert wurde, entfernt. Anschließend transfizierten wir transient INS-1E-Zellen mit entweder wildtypspezifischen oder Exon 6-deletierten Pax6 und markierten diese Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit einem Antikörper gegen Pax6, welcher spezifisch die TA des Pax6-Proteins bindet. Mittels Fluoreszenzmikroskop wurden die transfizierten Zellen dann hinsichtlich ihrer Pax6-Lokalisation ausgewertet. Das Ergebnis dieser Studie gibt die Abbildung 3.9 wieder. Während die Zellen mit Pax6-Protein, welches dem Wildtyp entspricht ein zu 72 % nukleär lokalisiertes Pax6-Protein aufwiesen, kam es infolge der Exon 6-Deletion, ähnlich den *in vivo* Studien mit Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten, zu einer signifikanten Umverteilung von Pax6, so dass dieses nur noch zu 43 % im Kern nachweisbar war ( $p=0,0006$ ). Die zytoplasmatische Lokalisation hingegen nahm im Vergleich mit den Zellen mit wildtypspezifischen Pax6 deutlich zu. Sie stieg von 16 % in Wildtyp-Pax6-transfizierten Zellen auf 39 % in Zellen mit deletierten Pax6 ( $p=0,0008$ ;  $n=3$ )

Unsere Hypothese wird durch dieses Ergebnis bestätigt. Trotzdem erklärt es nicht vollständig den Pankreasphänotyps der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation, da viele Zellen dennoch eine Pax6-Lokalisation im Zellkern zeigten.



**Abb. 3.9: Das Exon 6 von Pax6 ist bedeutend für die Lokalisation des Pax6-Proteins im Zellkern.**

INS-1E-Zellen wurden auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausgesät und transient mit wildtypspezifischen (pcDNA3-Pax6) oder Exon-6-deletierten (pcDNA3-Pax6ΔE6) Pax6 transfiziert. Nach einer Transfektionsdauer von 72 Stunden wurden die Zellen gegen Pax6 und zur Kerndarstellung mit TOPRO markiert. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Pax6-Lokalisation kategorisiert. Dabei wurden nur jene Zellen gewertet, die eine eindeutige Expression von Pax6 über dem Level endogenen Pax6 aufwiesen. A) Darstellung der quantitativen Analyse der Pax6-Lokalisation. B und C) Repräsentative konfokale Aufnahmen Pax6-überexprimierender INS-1E-Zellen mit nukleärer Lokalisation von Pax6, entsprechend dem WT (B) oder zytoplasmatischer Pax6-Lokalisation, entsprechend Pax6 mit fehlendem Exon 6 (C). Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Experimenten. \*\*\* $p < 0,001$ . WT=Wildtyp.

### 3.2 Neue molekulare Regulatoren von $\beta$ -Zellproliferation /-apoptose und -funktion

In der Pathogenese des Diabetes mellitus vom Typ 2 (T2DM) spielen neben der Insulinresistenz peripherer Gewebe auch Änderungen der Proliferations- und Apoptoserate sowie Funktionsänderungen pankreatischer  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle (Muio and Newgard, 2008; Rhodes, 2005). Die molekularen Defekte der  $\beta$ -Zellen, die bei dieser Erkrankung relevant sind, sind jedoch noch in vielen Punkten unklar. Wie bereits einleitend beschrieben (1.4.1) finden während der Schwangerschaft physiologisch-adaptive

Veränderungen der Langerhansschen Inseln, speziell der  $\beta$ -Zellen statt, die denen eines sich entwickelnden T2DM entgegengesetzt sind (Parsons et al., 1992). Daran beteiligte Mechanismen und Moleküle stellen somit potentielle Angriffspunkte für die Verbesserung der T2DM-Pathogenese dar.

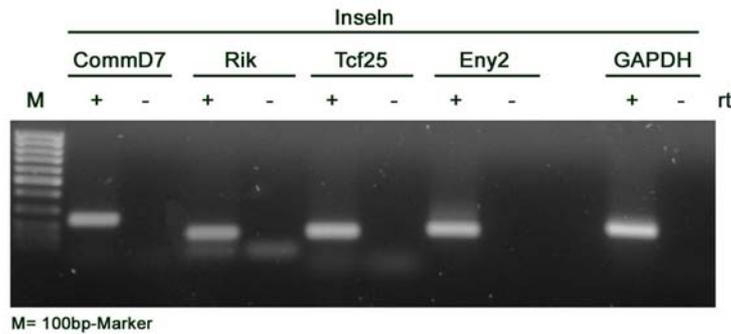
### 3.2.1 Identifizierung neuer Kandidatengene

Für den zweiten Projektteil dieser Arbeit wurden daher mRNA-Expressionsprofile Langerhansscher Inseln trächtiger Mäuse des Schwangerschaftstages 12,5, also ein Tag mit hoher Proliferationsrate sowie hoher Sekretionseffizienz der maternalen  $\beta$ -Zellen, mit mRNA-Expressionsprofilen von Inseln äquivalenter nicht-trächtiger Mäuse verglichen. Anhand dieser wurde eine Auswahl von vier Kandidatengenegen getroffen, um diese funktionell zu charakterisieren. Als Auswahlkriterien dienten dabei eine deutliche Regulation des Gens während der Schwangerschaft sowie eine weitgehend unbekannt Funktion.

Drei dieser Gene, die für die Proteine Commd7 (COMM domain containing 7), 1110008P14Rik (RIKEN cDNA 1110008P14 gene) und Eny2 (enhancer of yellow homolog (Drosophila)) kodieren, wiesen bei der Analyse der Microarraydaten eine deutlich signifikante Erhöhung hinsichtlich ihrer Expression auf. Für Commd7 war die Expression 1,6-fach, für 1110008P14 Rik, im weiteren Verlauf der Arbeit als Rik bezeichnet, 2,0-fach und für Eny2 1,8-fach gesteigert. Hingegen war die Expression des Genes, welches für das Protein Tcf25 (transcription factor 25) kodiert, signifikant, um das 2,2-fache, verringert.

#### 3.2.1.1 Nachweis der Expression der Kandidatengene in Langerhansschen Inseln von *mus musculus* C57BL/6 und in INS-1E-Insulinomzellen

Zunächst sollte bestätigt werden, ob die gewählten Kandidatengene tatsächlich unter physiologischen Bedingungen in den Langerhansinseln exprimiert werden. Dafür wurden sowohl die Pankreasinseln nicht trächtiger weiblicher als auch männlicher C57BL/6-Mäuse präpariert, aus ihnen die mRNA isoliert und rtPCR's durchgeführt. Wie Abbildung 3.10 am Beispiel eines männlichen C57BL/6-Tieres zeigt, werden sowohl Commd7, Rik, Tcf25 und auch Eny2, durch Darstellung von PCR-Fragmenten entsprechender Größe, physiologisch in den Mausinseln exprimiert.

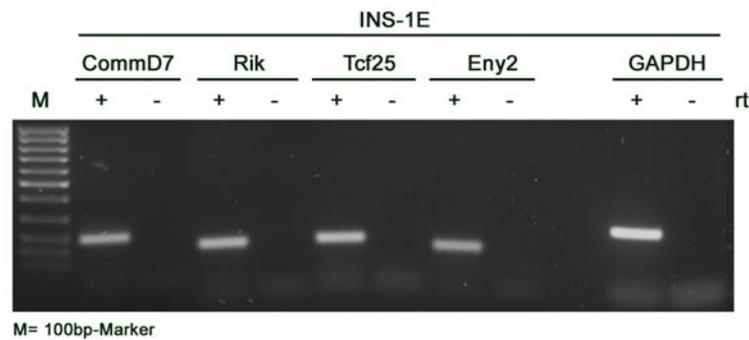


**Abb. 3.10: Nachweis der Kandidatengene in den Langerhansschen Inseln einer männlichen C57BL/6-Maus.**

Mittels rtPCR, mit entsprechenden Primern und der mRNA aus isolierten Inseln der Maus, ließ sich die Expression der gewählten Gene, unter physiologischen Bedingungen belegen. Es entstanden PCR-Produkte, welche jeweils die entsprechende Größe aufweisen. CommD7: 243bp; Rik: 159bp; Tcf25: 172bp; Eny2: 193bp; GAPDH: 223bp; -rt: entsprechende Negativkontrollen

Der Anteil der  $\beta$ -Zellen stellt mit rund 70-80 %, ähnlich anderer Spezies, den größten Zellanteil der Langerhansinsel eines Nagetieres dar (Kulkarni, 2004). Dennoch lässt sich durch einen Nachweis der Kandidatengene in der gesamten Insel nicht ausschließen, dass diese eventuell nicht in den  $\beta$ -Zellen exprimiert werden. Die Isolierung von  $\beta$ -Zellen aus den Pankreasinseln sowie die eigentliche Isolierung von Langerhansinseln, bedeuten jedoch einen erheblichen experimentellen und auch finanziellen Aufwand. Zudem sind für viele Untersuchungen enorme Mengen an isolierten pankreatischen Inseln nötig. Zur Bestätigung der Expression der ausgewählten Gene in  $\beta$ -Zellen und zu deren genaueren Untersuchung hinsichtlich ihrer Funktion, wurden daher INS-1E-Insulinomzellen verwendet. Es handelt sich dabei um Zellen, welche ursprünglich aus Insulinomzellen der Ratte generiert wurden. Überdies weisen sie über eine große Passagenspanne einen stabilen Differenzierungsgrad auf (Merglen et al., 2004) und etablierten sich deshalb zu einem viel verwendeten und angesehenen  $\beta$ -Zell-Modell. Die Arbeit mit Tumorzelllinien bietet gegenüber der Arbeit mit nicht immortalisierten Primärkulturen, neben den finanziellen und experimentellen Aspekten, auch hinsichtlich ethischer Gründe enorme Vorteile.

Für den Nachweis der Expression, der von uns gewählten Gene, in INS-1E-Zellen, wurde aus ihnen die mRNA isoliert und ebenfalls eine rtPCR mit entsprechenden Primern durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt, dass auch in diesen Zellen die Expression von CommD7, Rik, Tcf25 und Eny2 unter normalen Kulturbedingungen (serumhaltiges Medium) erfolgt.



**Abb. 3.11: Nachweis der Gene CommD7, Rik, Tcf25 und Eny2 in INS-1E Ratteninsulinomzellen.**

In der isolierten mRNA von INS-1E-Zellen ließen sich die gewünschten Gene durch rtPCR mit entsprechenden Primern nachweisen. Die entstandenen PCR-Fragmente weisen die richtige Größe auf. CommD7: 200bp; Rik: 155bp; Tcf25: 161bp; Eny2 134bp und GAPDH: 223bp; - rt: entsprechende Negativkontrollen

### 3.2.2 Untersuchung der Funktion der Kandidatengene in INS-1E-Insulinomzellen durch Überexpression

Unter Kulturbedingungen werden die Kandidatengene in den INS-1E-Insulinomzellen exprimiert. Um Einblicke über ihre physiologische Funktion zu erhalten, sollte das Expressionsniveau dieser Gene in den Zellen moduliert und die dadurch resultierenden Veränderungen erfasst werden. Eine Veränderung der Expression sollte zunächst durch homologe Überexpression erfolgen. Dafür muss die DNA des entsprechenden Gens, unter dem Einfluss eines hinreichend starken, entweder konstitutiven oder induzierbaren Promotors, in die Zellen eingeführt werden, was entweder mittels Viren oder, wie in unserem Fall, über entsprechende eukaryontische Expressionsvektoren erreicht werden kann. Eukaryontische Expressionsvektoren sind meist Shuttlevektoren. Dies bedeutet, dass die in sie integrierte DNA zunächst in Bakterien vermehrt wird. Dafür bedarf es eines Replikationsursprungs und mindestens eines Resistenzgens zur anschließenden Selektion. Die Expression des gewünschten Gens erfolgt dann in der eukaryontischen Zelle. Dies setzt voraus, dass der Expressionsvektor auch über einen entsprechend starken eukaryontischen Promotor und natürlich über das offene Leseraster, welches für das gewünschte Protein kodiert sowie über ein Polyadenylierungssignal verfügt. Uns diente als Ausgangsvektor für die konstitutive Überexpression der gewählten Kandidatengene in den INS-1E-Zellen der Expressionsvektor pcDNA3.

### 3.2.2.1 Herstellung von Expressionsvektoren und Optimierungsversuche zur Überexpression der Kandidatengene in INS-1E-Insulinomzellen

Die Tatsache, dass es für keines der durch die gewählten Kandidatengene kodierten, Proteine kommerziell erhältliche spezifische Antikörper (AK) gab und somit weder ein Expressionsnachweis dieser Gene noch Optimierungsversuche auf Proteinebene möglich waren, machte es erforderlich, zunächst ein Fusionsprotein, bestehend aus Kandidatengen und einem Tag (Markerstruktur), herzustellen. So genannte Tags sind kurze endständige Peptide, die an den N- oder C-Terminus des Wunschproteins fusioniert werden. Sie dienen zum Nachweis des überexprimierenden Gens und beeinflussen nur selten die Struktur und Faltung des resultierenden Proteins. Der von uns gewählte HA-Tag ist ein vom Influenza-Hämagglutininprotein abstammendes Epitop, zu dessen Nachweis zahlreiche Antikörper zu beziehen sind und wurde von uns an das carboxyterminale Ende der Kandidatenproteine fusioniert. Da jedoch ein störender Einfluss des HA-Tag's auf die Proteinfunktion nicht absolut auszuschließen ist, sollte der HA-Tag für die eigentlichen Funktionsanalysen auch wieder entfernt werden können.

Unter Verwendung spezifischer Primer, die komplementär zum Translationsstart und -stopp der Kandidatengen-cDNA waren, wurden die kodierenden Regionen der jeweiligen Kandidatengen-cDNA aus entsprechenden kommerziell bezogenen Plasmiden (siehe Material- und Methodenteil 2.3.2.1) per PCR amplifiziert. Da die gewählten Primer Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI (5'Primer) und *Eco*RV (3'Primer) enthielten, konnte die amplifizierte Kandidatengen-cDNA über die *Bam*HI und *Eco*RV Schnittstellen in die MCS des pcDNA3- Expressionsvektors kloniert werden (Abb. 3.12 A). Der 3'Primer enthielt zusätzlich noch die Sequenz des HA-Tag's und eine weitere Restriktionsschnittstelle für *Bst*EII. Durch einen Restriktionsverdau mit *Bst*EII und *Eco*RV und anschließender Religation des Vektors konnte so die Entfernung des HA-Tag's gewährleistet werden (Abb. 3.12 B). Die Religation des Vektors führte außerdem zur Bildung eines Stoppcodons am Carboxylende des integrierten Gens. Die erfolgreiche Klonierung wurde jeweils durch Restriktionsanalysen überprüft. Zusätzlich wurden die Kandidatengen-Inserts des pcDNA3-Vektors vollständig sequenziert, um auszuschließen, dass durch die PCR mögliche Punktmutationen eingeführt wurden.

Zur Optimierung der Transfektion in INS-1E-Zellen diente ein EGFP-N1-Vektor. Basierend auf diese Optimierungsexperimente wurden INS-1E-Zellen letztendlich mit einer DNA-Konzentration von 2 µg bei einem Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz von 1:3 transfiziert. Von den transfizierten INS-1E-Zellen wurden detergenzlösliche Gesamtzellextrakte hergestellt und die Expression des Kandidatengens, durch Nachweis des fusionierten HA-Tag's mit spezifischem Antikörper am Western-Blot, analysiert. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch am Beispiel von Rik (10,5 kDa), dass es zum einen zur Expression

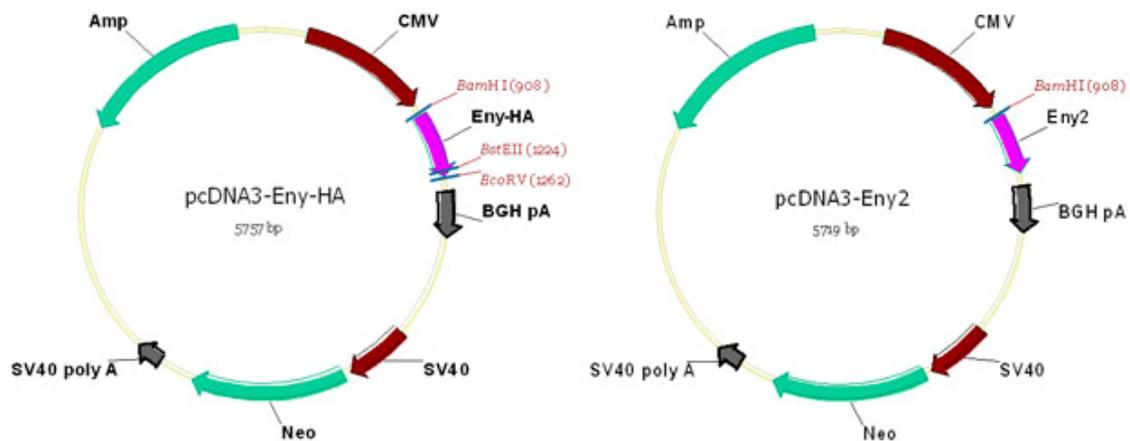
des transfizierten Kandidatengens kommt und überdies zeigt eine zunehmende Bandenintensität, bis zu einer Transfektionszeit von 72 Stunden, eine Zunahme der Expression bis zu diesem Zeitpunkt an. Bei einer längeren Transfektionszeit (96 h) ist wieder eine Abnahme der Bandenstärke zu verzeichnen, so dass die größten Auswirkungen einer Überexpression der Kandidatengene auf die Funktion der Zelle während einer Transfektionszeit von 72-96 Stunden zu erwarten sind.

Anzumerken ist, dass der Nachweis der Expression von Eny2 (13 kDa), durch Darstellung des HA-Tags im Western-Blot, im Gegensatz zu den anderen Kandidatengenen (Commd7: 22,6 kDa; Tcf25: 71 kDa), trotz verschiedener Optimierungsversuche nicht gelang.

A

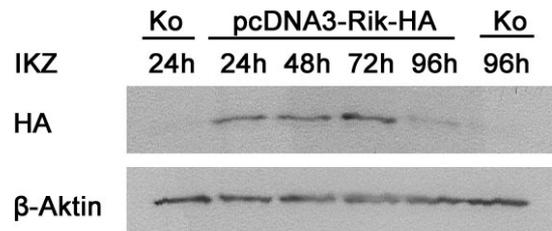


B



**Abb. 3.12: Aufbau des klonierten eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.**

A) Aufbau des in das pcDNA3 Plasmid integrierten Inserts mit flankierenden pcDNA3-Anteilen. Mittels PCR wurde die Maus-cDNA des entsprechenden Kandidatengens aus kommerziell bezogenen Plasmiden und zusätzlich eingeführten HA-Tag's amplifiziert und über entsprechende Restriktionsschnittstellen in die MCS des pcDNA3 Expressionsvektors kloniert. Die Korrektheit der integrierten Sequenz wurde durch Sequenzierung mit Hilfe des T7- und Sp6-Primers überprüft. B) Klonierter pcDNA3-Expressionsvektor mit und ohne Epitop-Tag am Bsp. des Kandidatengens Eny2. Eny2 wurde wie oben beschrieben zunächst mit HA-Tag in den Vektor ligiert. Für die eigentlichen funktionellen Untersuchungen wurde der HA-Tag durch Verdau mit den Enzymen BstEII und EcoRV wieder entfernt und durch die anschließende Religation die Entstehung eines Stoppcodons gewährleistet.



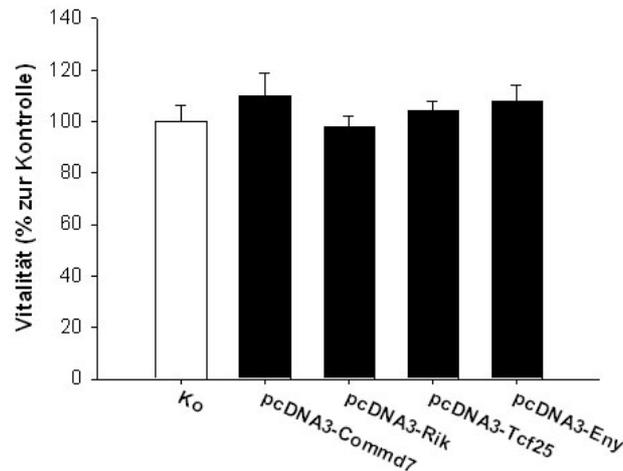
**Abb. 3.13: Zeitabhängige Expression eines Kandidatengens nach transienter Transfektion von INS-1E-Zellen am Beispiel von Rik.**

INS-1E-Zellen wurden transient mit entweder 2 $\mu$ g Kontrollplasmid (pcDNA3) oder pcDNA3-Rik-HA transfiziert. Aus den Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Gesamtzellproteinextrakte hergestellt, diese elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferriert. Der Nachweis des Kandidatengens erfolgte anschließend durch immunologische Detektion des fusionierten HA-Tags mit spezifischem HA-Antikörper. Die Überprüfung des Einsatzes gleicher Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion von  $\beta$ -Aktin an derselben PVDF-Membran, nach dem bereits gebundene AK durch „Strippen“ der Membran entfernt wurden. Dargestellt ist eins von 3 unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten. Ko, Kontrollplasmid; IKZ, Inkubationszeit

### 3.2.2.2 Einfluss der transienten Überexpression der Kandidatengene auf die Proliferation / Vitalität von INS-1E-Insulinomzellen

Ein entscheidender Adaptationsvorgang der  $\beta$ -Zellen an den erhöhten Bedarf an Insulin, aufgrund einer sich entwickelnden Insulinresistenz, schwangerschaftsbedingt, aber auch nicht schwangerschaftsbedingt, ist die Erhöhung der  $\beta$ -Zellmasse infolge gesteigerter Proliferationsvorgänge. Überexpressionsversuche sollten daher der Auswirkung der gewählten Kandidatengene auf diesen Mechanismus nachgehen. Zu diesem Zweck wurden INS-1E-Zellen transient mit Kontroll- bzw. kandidatengentragendem Plasmid transfiziert. Nach einer entsprechenden Transfektionsdauer wurde dann ein MTT-Test durchgeführt um Rückschlüsse auf die Vitalität und damit die Proliferation der Zellen zu erhalten.

Wie im Vergleich mit den Kontrollzellen in der Abbildung 3.14 dargestellt, kam es infolge der Überexpression durch keines der gewählten Kandidatengene zu einer signifikanten Veränderung in der Vitalität.

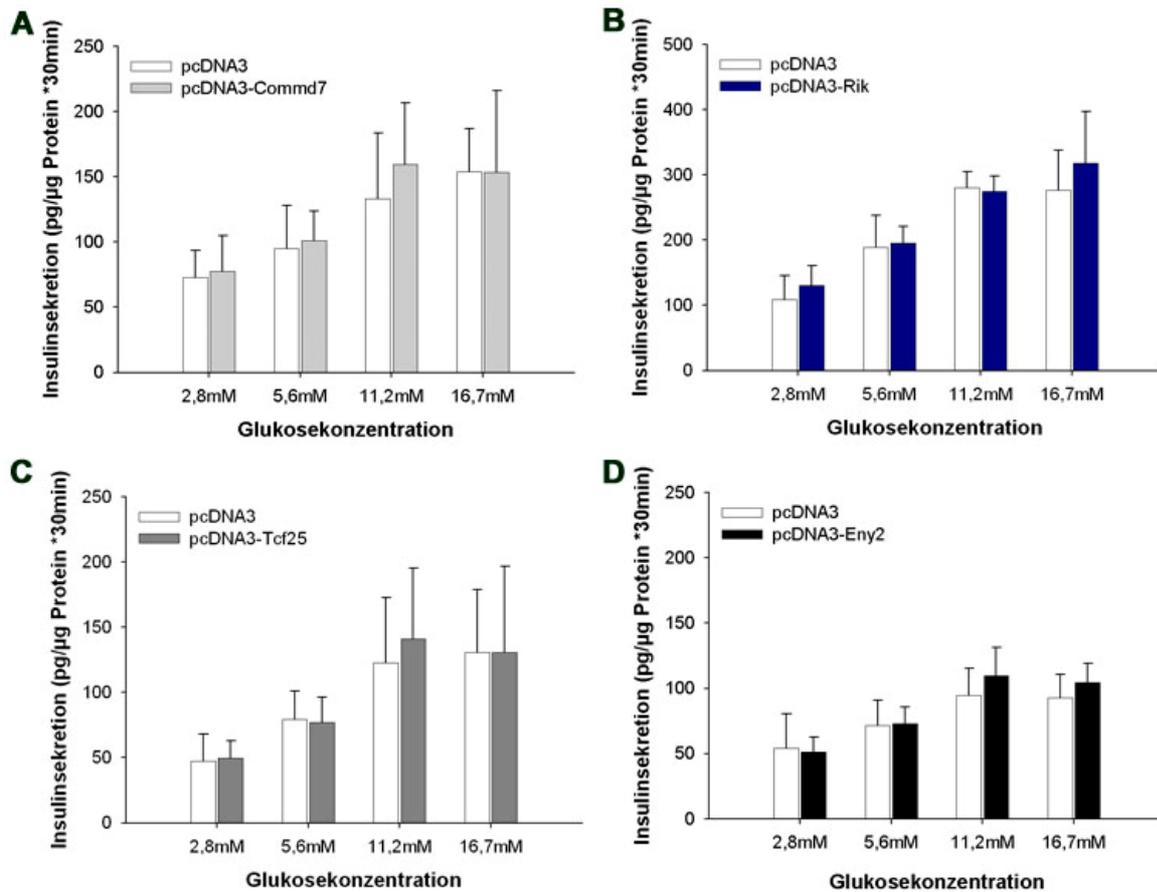


**Abb. 3.14: Infolge der Überexpression der Kandidatengene zeigt sich keine Veränderung in der Vitalität von INS-1E-Zellen.**

INS-1E-Zellen wurden transient mit dem angegebenen Kandidatengen transfiziert und die Proliferation / Vitalität mittels MTT-Test bestimmt. Im Vergleich mit kontrolltransfizierten Zellen (pcDNA3) konnte diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Ko, Kontrolle

### 3.2.2.3 Einfluss der transienten Überexpression der Kandidatengene auf die glukoseabhängige Insulinsekretion von INS-1E-Insulinomzellen

Ein weiterer entscheidender Adaptationsmechanismus der  $\beta$ -Zellen an einen erhöhten Insulinbedarf ist die Erhöhung der sekretorischen Funktion. INS-1E-Zellen wurden daher transient mit dem kandidatengentragenden Vektor bzw. mit Leervektor transfiziert und nach drei Tagen die Insulinsekretion nach Stimulation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen gemessen. Weder durch Überexpression von Commd7, Rik, Tcf25 noch von Eny2 konnte eine signifikante Veränderung der glukoseabhängigen Insulinsekretion, im Vergleich mit Kontrollzellen, gezeigt werden (Abb. 3.15). Sowohl bei Kontrollzellen als auch bei den Testzellen kam es glukoseabhängig zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Auffällig war, dass diese Steigerung meist nur bis zu einer Glukosekonzentration von 11,2 mM auftrat und es ab einer Glukosekonzentration von 16,7 mM zu keiner weiteren Erhöhung der Insulinsekretion kam. Ebenso auffallend war die unterschiedliche Steigerungsrate der Insulinsekretion von basaler (2,8 mM) zu hoher (16,7 mM) Glukosekonzentration bei den verschiedenen Versuchen. Bei dem Experiment mit pcDNA3 vs. pcDNA3-Eny2 (D in Abb. 3.15) kam es zu einer Erhöhung der Insulinsekretion von basal  $54,03 \pm 26,29$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min auf  $92,73 \pm 17,89$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min bei Hoch-Glukose, was einer Erhöhung der Insulinsekretionsrate um 72 % entspricht. Das Experiment mit pcDNA3 vs. pcDNA3-Rik (B in Abb. 3.15) hingegen zeigt eine Steigerung der Insulinsekretion um 154 % von basaler zu hoher Glukosekonzentration (basal  $109 \pm 36,42$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min vs. Hoch-Glukose  $276,86 \pm 60,79$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min).



**Abb. 3.15: Eine Überexpression der Kandidatengene hat keinen Einfluss auf die Insulinsekretion von INS-1E-Zellen.**

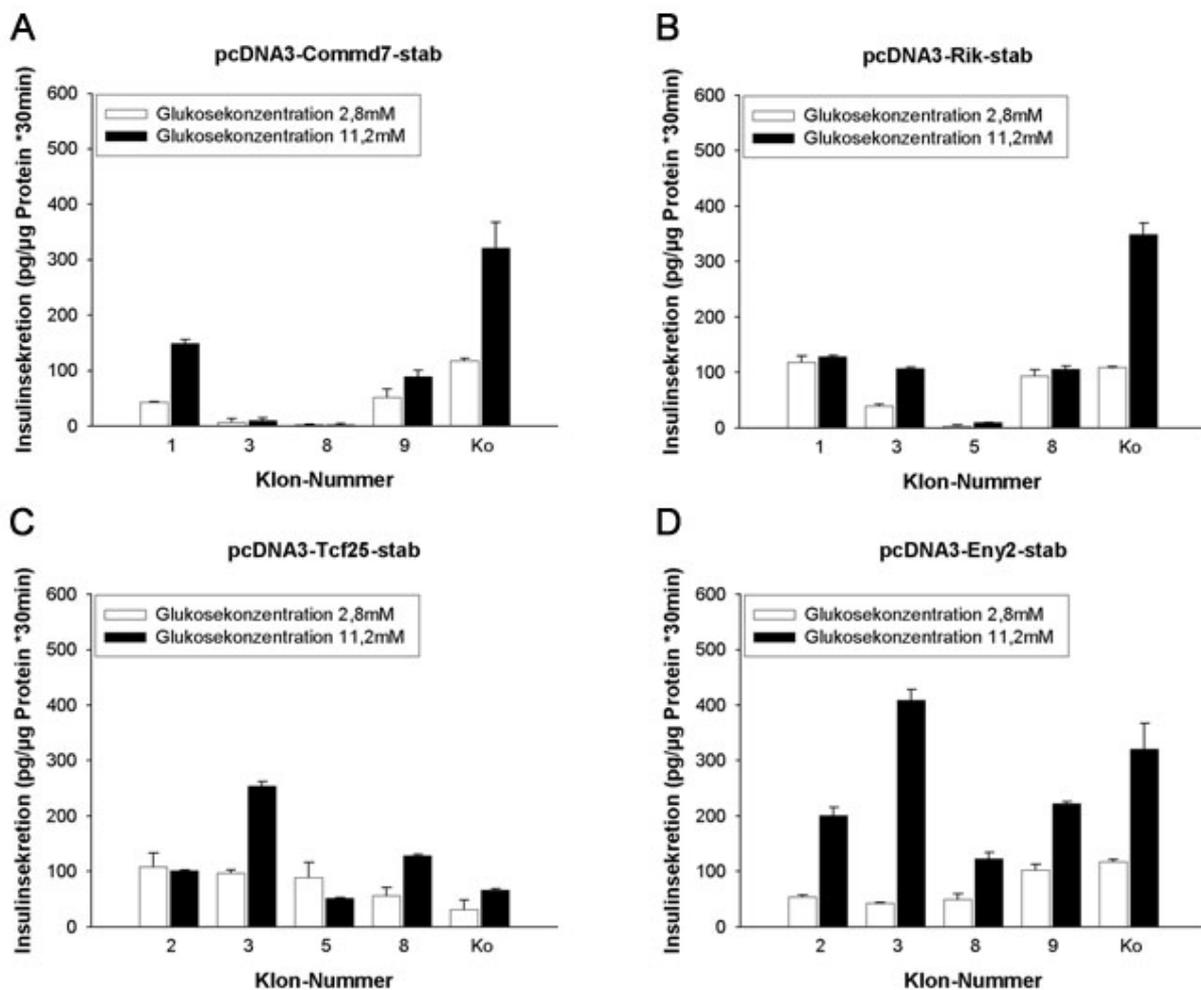
Die Insulinsekretion von INS-1E-Zellen, die entweder mit A) pcDNA3-Commd7 B) pcDNA3-Rik C) pcDNA3-Tcf25 oder pcDNA3-Eny2 transient transfiziert wurden, wurde mit der Insulinsekretion entsprechender Kontrollzellen verglichen, wobei kein signifikanter Unterschied feststellbar war. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 3 bis 5 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.2.4 Einfluss stabiler Überexpression der Kandidatengene auf die glukoseabhängige Insulinsekretion von INS-1E-Insulinomzellen

Durch transiente Überexpression konnte bei keinem der Kandidatengene ein Einfluss auf die Funktion der INS-1E-Zellen hinsichtlich der Insulinsekretion, der Hauptaufgabe von  $\beta$ -Zellen, festgestellt werden. Ob dies ein Phänomen einer eventuell zu geringen Transfektionseffizienz war, sollte durch die Herstellung stabil überexprimierender Zellklone umgangen werden.

Zur Herstellung stabiler INS-1E-Zelllinien, die eine Überexpression der Kandidatengene aufweisen, wurden frisch ausgesäte INS1E-Zellen durch Lipofektion mit entsprechendem linearisierten Expressionsvektor transfiziert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurden diese dem Antibiotikum G418 ausgesetzt. Stabile Einzelklone wurden dann durch eine limitierte Verdünnung in 96 Loch-Mikrotiterplatten erzeugt (Davies, 1994). Anschließend wurden diese Klone in Hinblick auf ihre glukoseinduzierte Insulinsekretion überprüft. Wie aus der Abbildung 3.16 ersichtlich wird, welche nur einige der generierten stabilen Klone zeigt,

bestand zwischen den einzelnen Zellklonen eine hohe Variabilität bezüglich ihrer Sekretionsantwort auf Glukose. Es entstanden zum einen Klone, die im Vergleich mit der Kontrolle sowohl basal als auch glukoseinduziert kaum Insulin sezernierten (Abb. 3.16 A) Klon 3 und 8; B) Klon 5) oder solche, die zwar eine basale Insulinsekretion aufweisen, jedoch nicht mit einer Steigerung der Insulinsekretion auf hohe Glukosewerte reagieren, zum anderen wurden auch Klone erzeugt, dessen Insulinsekretion unter Hochglukose 9,6-fach anstieg (Abb. 3.16 D) Klon 3). Daneben zeigten sich ebenfalls Klone bei denen unter Glukoseerhöhung ein Abfall der Insulinsekretion zu verzeichnen war (Abb. 3.16 C) Klon 5). Auch die mitgeführten Kontrollen (stabil mit Insert-freiem pcDNA3-Vektor transfizierte Zellen) verhielten sich in ihrer Sekretionsantwort zum Teil untypisch (Abb. 3.16 C).



**Abb. 3.16: Insulinsekretion einiger stabil mit Kandidatengen transfizierter INS-1E-Zellklone.**

INS-1E-Zellen wurden entweder stabil mit A) Commd7, B) Rik, C) Tcf25 oder D) Eny2 transfiziert. Die entstandenen Zellklone wurden dann auf ihre glukoseinduzierte Insulinsekretion hin überprüft. Bei allen 4 Kandidatengen zeigte sich eine große Variabilität der Insulinsekretion zwischen den einzelnen Klonpopulationen, als Antwort auf verschiedene Glukosekonzentrationen.

### **3.2.2.5 Herstellung induzierbarer stabil überexprimierender INS-1E - Klone**

Oftmals ist die konstitutive Überexpression eines Gens mit Problemen behaftet. Eine Möglichkeit die Expression zu kontrollieren, bzw. zu regulieren bietet das Tet-Off-System das ursprünglich von Gossen und Bujard entwickelt worden ist (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Das Tet-Off-System besteht im Wesentlichen aus Zwei Komponenten, dem Regulator- und dem Antwort-Plasmid. Während das Regulatorkonstrukt für den tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator), einem Fusionsprotein, kodiert, enthält das Antwort-Plasmid die zu exprimierende cDNA, welche unter der Kontrolle des TRE (tet responsive element) steht. Sowohl Regulator als auch Antwortkonstrukt werden stabil in die Zellen transfiziert. Während in Anwesenheit von Tet (Tetracyclin), bzw. Dox (Doxycyclin), einem Derivat des Tetracyklins, die Expression des Gens verhindert wird, führt die Abwesenheit des Antibiotikums zu einer Induktion der Genexpression. Unter dem Einfluss von Dox entsteht ein Dox-tTA-Komplex, der nicht an das TRE binden kann, was die Expression des Gens unterdrückt. Die Aktivierung, bzw. Inaktivierung der Genexpression hängt dabei von der Dosis der Dox-Menge ab, was eine Feinregulation der Genexpression ermöglicht.

INS-1E-Insulinomzellen wurden in einem ersten Schritt stabil mit dem Regulatorkonstrukt, dem Plasmid pTet-Off-Advanced, transfiziert. Der Erfolg dieser Transfektion konnte im Western-Blot, durch einen spezifischen AK gegen das vom Regulatorplasmid kodierte TetR, belegt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Von den erzeugten Klonen wurden dann jene selektiert, die eine hohe Dox-abhängige Induktion der Genexpression bei geringer Hintergrund-Expression aufwiesen. Zu diesem Zweck wurden die Klone mit dem Aktivator-Plasmid pTRE-Tight-Luc, welches anstelle der cDNA eines Kandidatengens das Gen für die Luciferase trägt, transient transfiziert. Anschließend wurde die Dox-abhängige Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Assay bestimmt (Ergebnisse nicht dargestellt). Nachfolgend sollten die so ermittelten Klone einer zweiten stabilen Transfektion mit dem Antwortkonstrukt pTRE-Tight, welches die cDNA des jeweiligen Kandidatengens trägt, unterzogen werden. Trotz wiederholter Optimierungsversuche war es nicht möglich eine zweite stabile Transfektion an den INS-1E-Zellen durchzuführen, da die Zellen jedes Mal abstarben. Der methodische Ansatz der stabilen Überexpression wurde aufgrund dieses Problems, neben den oben aufgeführten Problemen nicht weiter verfolgt.

### **3.2.3 Analyse der Funktion eines ausgesuchten Kandidatengens durch siRNA vermittelte Suppression der Expression in INS-1E-Zellen**

Der Mechanismus der RNA Interferenz konnte erstmals Anfang der 90iger Jahre in Pflanzen und Plattwürmern beschrieben werden (Fire et al., 1991; Napoli et al., 1990; van der Krol et

al., 1990). Es handelt sich dabei um einen in der Evolution konservierten Prozess, welcher der posttranskriptionalen Regulation der Expression von Genen dient und als so genanntes gene silencing bezeichnet wird. Vermittelt wird dieser Prozess, zumindest in höheren eukaryontischen Zellen, durch kurze doppelsträngige RNA Moleküle, den siRNAs (Elbashir et al., 2001). Durch komplementäre Bindung der siRNAs an mRNA Moleküle wird deren sequenzspezifische Degradation bewirkt, wodurch die Expression des entsprechenden Proteins reduziert wird. Somit ist es möglich die Expression eines bestimmten Proteins, durch den Einsatz zielgerichtet-designter siRNAs zu inhibieren. Der Vorgang der RNA Interferenz bietet daher, neben der Überexpression, eine weitere Möglichkeit die Expression der gewählten Gene in INS-1E-Zellen zu beeinflussen.

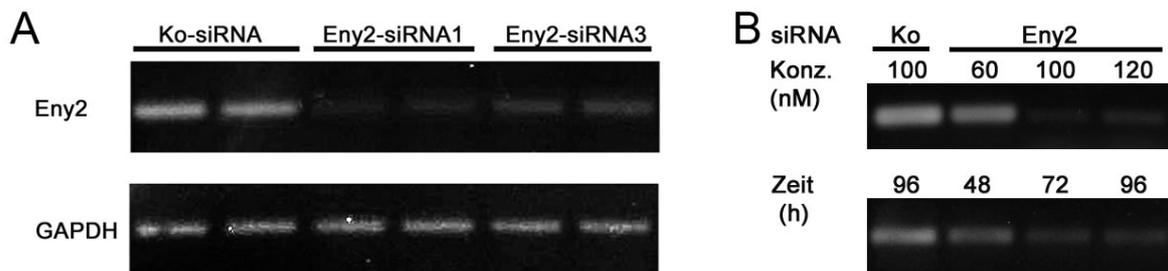
Von den anfänglich ausgesuchten Kandidatengenen wurde Eny2 für weitere nähere Funktionsanalysen durch Modulation des Expressionsniveau mittels siRNA ausgewählt. Es handelt sich hierbei um ein in der Evolution hochkonserviertes Protein mit multifunktionalen Eigenschaften. Es ist zum einen beteiligt an der nukleären Gentranskription (Kurshakova et al., 2007; Zhao et al., 2008) sowie am Transport der mRNA aus dem Kern ins Zytoplasma (Jani et al., 2009; Pascual-Garcia et al., 2008; Pascual-Garcia and Rodriguez-Navarro, 2009), zum anderen wird Eny2, bzw. dessen Homolog in der Hefe, Sus1, auch mit dem mRNA-Metabolismus im Zytoplasma in Verbindung gebracht (Cuenca-Bono et al., 2010).

### **3.2.3.1 Suppression der Expression von Eny2 in INS-1E-Zellen nach Transfektion mit siRNA's**

Für die Untersuchung des Einflusses einer Suppression von Eny2 auf die Funktion von INS-1E-Zellen standen zwei verschiedene Eny2-siRNAs zur Verfügung, deren Spezifität zunächst ausgetestet werden musste. Dazu wurden INS-1E-Zellen, in Anlehnung an die Herstellerangaben, revers mit zunächst 100 nM entweder Kontroll-siRNA oder Eny2-siRNA1, bzw. -3 transfiziert, nach 72 h die mRNA isoliert und durch reverse Transkription cDNA hergestellt. Anschließend wurde eine semiquantitative PCR mit spezifischen Eny2-Primern durchgeführt. Zur Quantifizierung der einzusetzenden cDNA-Mengen diente die Expression des Haushaltsgens (*housekeeping gene*) GAPDH (Apostolakos et al., 1993; Zhao et al., 1995). Wie die Abbildung 3.17 A zeigt, vermochten sowohl die Eny2-siRNA1 als auch die Eny2-siRNA3, im Vergleich zur Kontrolle, die Expression von Eny2 in INS-1E-Zellen zu inhibieren, wobei anzumerken ist, dass die Eny2-siRNA1 im Vergleich mit der Eny2-siRNA3 die Expression von Eny2 in größerem Ausmaße zu beeinflussen scheint.

Anschließend mussten die Transfektionsbedingungen der zur Suppression von Eny2 gewählten siRNAs optimiert werden. INS-1E-Zellen wurden zu diesem Zweck wiederum

revers, entweder mit unterschiedlichen Konzentrationen (60 nM, 100 nM bzw. 120 nM), bzw. unterschiedlich lang (48 h, 72 h und 96 h) mit entsprechender siRNA transfiziert, die mRNA isoliert und eine semiquantitative rtPCR durchgeführt. Wie in Abb. 3.17 B zu sehen, zeigten die zur Transfektion eingesetzte Konzentration von 100 nM Eny2-siRNA und eine Transfektionsdauer von 72 – 96 Stunden die größten Auswirkungen hinsichtlich der Inhibierung der Expression von Eny2.



**Abb. 3.17: Überprüfung der Suppression der Expression von Eny2 nach Transfektion mit 2 verschiedenen Eny2-siRNA's und Optimierungsversuche zum Einsatz der Eny2-siRNA's.**

A) INS-1E-Zellen wurden revers mit 2 verschiedenen Eny2-siRNA's (Eny2-siRNA1 und 3) transfiziert. Nach 72 h erfolgte die RNA-Isolierung und eine semiquantitative rtPCR mit entsprechenden Primern. Beide eingesetzten Eny2-siRNA's bewirken eine Suppression der Expression von Eny2. B) INS-1E-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen, bzw. unterschiedlich lang mit Eny2-siRNA3 behandelt und die Expression von Eny2 über semiquantitative rtPCR bestimmt. Ko, Kontrolle

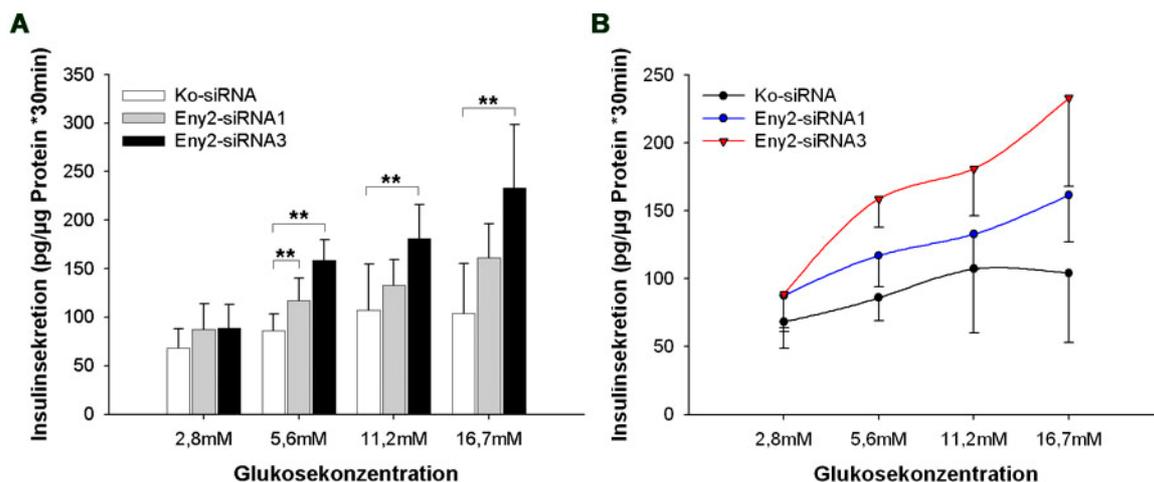
### 3.2.3.2 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die glukosestimulierte Insulinsekretion von INS1-E Zellen

Nach dem die Bedingungen der siRNA Transfektion zur Suppression von Eny2 in INS-1E-Zellen optimiert waren, wurde in einem ersten Schritt der Wirkung einer Inhibierung von Eny2 in INS-1E-Zellen auf die glukoseabhängige Insulinsekretion nachgegangen. INS-1E-Zellen wurden zu diesem Zweck jeweils im Doppelansatz mit 100 nM der entsprechenden Eny2-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transient revers transfiziert und die glukoseabhängige Insulinsekretion nach einer Transfektionsdauer von 72-96 h bestimmt. Dabei wurden die folgenden Glukosekonzentrationen verwendet: 2,8 mM, 5,6 mM, 11,2 mM und 16,7 mM. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

Während eine basale Glukosekonzentration (2,8 mM) keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen bewirkte (Kontrolle:  $68,2 \pm 19,5$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min vs. Eny2-siRNA1:  $87,6 \pm 26,4$  bzw. -siRNA3:  $88,6 \pm 24,7$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min; n=5), kam es bei den höheren Glukosekonzentrationen zu einem steilerem Anstieg der Insulinsekretion nach Eny2-Suppression. Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM. Diese Glukosekonzentration führte in Kontrollzellen zu einem 52 %-igen Anstieg der

Insulinsekretion auf  $104,1 \pm 50,9$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min gegenüber basal. Im Vergleich dazu kam es in Eny2-siRNA1 und 3 transfizierten Zellen unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion um 85 % bzw. 163 % auf  $161,4 \pm 34,6$  bzw.  $233,2 \pm 65$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min;  $p=0,0018$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA3).

Beide siRNAs zur Suppression der Expression von Eny2 bewirkten eine signifikante Erhöhung der Insulinsekretion ab einer Glukosekonzentration von 5,6 mM gegenüber der Kontrolle, wobei, wie dem Diagramm zu entnehmen ist, Eny2-siRNA3, also die Eny2-siRNA mit der weniger ausgeprägten Inhibierung von Eny2 auf mRNA-Niveau, zu einem größeren Anstieg in der glukoseabhängigen Insulinsekretion führte. Die Darstellung der Insulinsekretionswerte von Kontroll- und Eny2-siRNA transfizierten Zellen im Liniendiagramm (Abb. 3.18 B) zeigt zudem, dass es bei den von uns verwendeten INS-1E-Zellen unter der Wirkung der Eny2-siRNAs nicht zu der, bereits unter 3.2.2.3 beschriebenen, einsetzenden Sättigung der Insulinsekretion ab einem Glukosewert von 11,2 mM kam, sondern noch eine Erhöhung der Sekretionswerte bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM zu verzeichnen war.



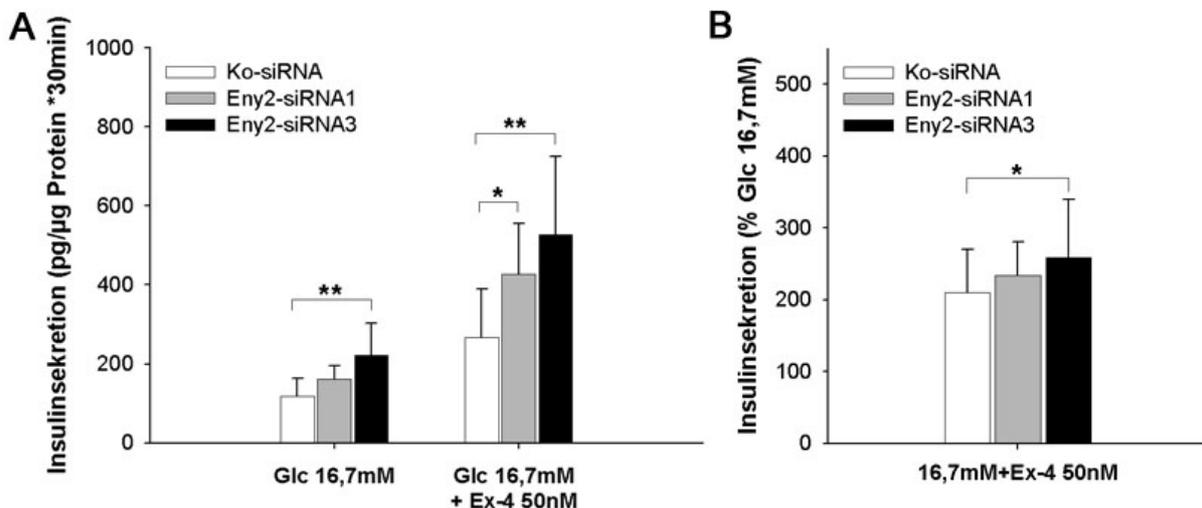
**Abb. 3.18: Eny2-Suppression führt zu einer gesteigerten glukosestimulierten Insulinsekretion in INS-1E-Zellen.**

INS-1E-Zellen wurden transient revers mit Kontroll- bzw. zwei verschiedenen Eny2-siRNAs (Eny2-siRNA1 und 3) transfiziert. Nach 72-96 h wurden die Zellen gewaschen und 30 min mit den angegebenen Glukosekonzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Insulinsekretion mittels ELISA bestimmt. A) Die Suppression von Eny2 durch die entsprechenden siRNAs bewirkt eine gesteigerte Insulinsekretion bei höherer Glukosekonzentration. B) Darstellung der Werte von A im Liniendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 5 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle. Die Daten wurden unter Benutzung der einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test miteinander verglichen.

### 3.2.3.3 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die inkretinabhängige Insulinsekretion von INS1-E Zellen

Ebenso ausgeprägt wie die Insulinsekretion bei höheren Glukosekonzentrationen, veränderte sich die inkretinvermittelte Insulinsekretion nach Eny2-Suppression (Abb. 3.19). Unter der Einwirkung von 50 nM Exendin-4, einem GLP-1-Rezeptor Agonisten (Goke et al., 1993; Thorens et al., 1993), zusammen mit 16,7 mM Glukose kam es, bezogen auf 16,7 mM Glukose allein, in Kontrollzellen zu einem Anstieg der Insulinsekretion um 109,81 % von  $125,37 \pm 44,37$  auf  $264,87 \pm 126,65$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min. Im Vergleich dazu führte eine Suppression von Eny2 in INS-1E-Insulinomzellen, zu Anstiegen in der Insulinsekretion um 134,0 % für die Eny2-siRNA1 bzw. 158,16 % für die Eny2-siRNA3 von  $162,89 \pm 37,99$  auf  $380,71 \pm 101,35$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min ( $p=0,002$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA1;  $n=5$ ) bzw. von  $227,07 \pm 82,18$  auf  $554,14 \pm 177,23$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min ( $p=3,42 \cdot 10^{-7}$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA3;  $n=8$ ).

Verglichen mit entsprechenden Kontrollen, zeigt auch die Messung der inkretinabhängigen Insulinsekretion, dass beide zur Eny2-Suppression eingesetzten siRNAs zu insgesamt signifikant höheren Insulinsekretionswerten führten. Es ist jedoch anzumerken, dass die prozentuale Zunahme der Insulinsekretion unter Ex-4 gegenüber 16,7 mM Glukose allein nur bei der Eny2-siRNA3 signifikant gesteigert war (Abb. 3.19 B).

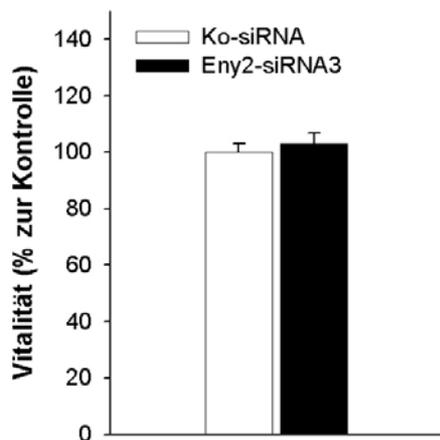


**Abb. 3.19: Eny2-Suppression führt zu einer gesteigerten inkretinabhängigen Insulinsekretion in INS-1E-Zellen.**

INS-1E-Zellen wurden transient mit Kontroll- bzw. zwei verschiedenen Eny2-siRNAs (1 und 3) transfiziert. Nach 72-96 h wurden die Zellen gewaschen und 30 min mit 16,7 mM Glukose bzw. 16,7 mM Glukose und 50 nM Ex-4 inkubiert. Anschließend wurde die Insulinsekretion bestimmt. A) Insulinsekretion von Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen ausgedrückt als pg/ $\mu$ g Protein \*30 min B) Zunahme der Insulinsekretion unter der Wirkung von Ex-4 gegenüber 16,7 mM Glukose ausgedrückt in %. Glc, Glukose; Ex-4, Exendin-4. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 5-8 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle. Die Daten wurden unter Benutzung der einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test miteinander verglichen.

### 3.2.3.4 Wirkungen der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Vitalität von INS-1E-Zellen

Ob eine Suppression von Eny2 auch einen Einfluss auf die Proliferation bzw. Vitalität von INS-1E-Insulinomzellen ausübt, wurde mittels MTT-Reagenz überprüft. Dafür wurden INS-1E-Zellen revers mit entweder Kontroll- oder Eny2-siRNA transfiziert. Nach einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden wurde, ohne zusätzlichen Waschschrift, in das Medium der transfizierten Zellen das gelbe MTT-Reagenz gegeben und nach einer entsprechenden Inkubationszeit die Zellvitalität indirekt über die sich gebildeten violetten Formazankristalle photometrisch bestimmt. Wie in der Abbildung 3.20 dargestellt, konnte hinsichtlich der Vitalität kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit inhibierter Eny2-Expression festgestellt werden ( $99,9 \pm 2,9$  % in Kontrollzellen vs.  $103,2 \pm 3,5$  % in Eny2-supprimierten Zellen;  $p=0,07$ ).

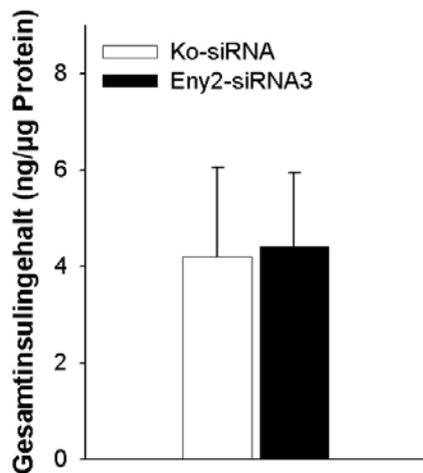


**Abb. 3.20: Die Suppression von Eny2 zeigt keine Auswirkung auf die Vitalität von INS1-E Zellen.**

INS-1E-Zellen wurden revers transfiziert und die Zellvitalität nach 72-96 h mittels MTT-Reagenz ermittelt. n=3

### 3.2.3.5 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Insulingehalt von INS-1E-Zellen

Wie oben aufgezeigt, kommt es nach Eny2-Suppression sowohl zu einer gesteigerten glukose- als auch inkretinabhängigen Insulinsekretion. Ob diese Steigerung eventuell mit einem erhöhten Insulingehalt einhergeht, wurde nachfolgend überprüft. Nach reverser Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Eny2-siRNA3 und einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden wurden die INS-1E-Zellen gewaschen und homogenisiert. Aus den gewonnenen Zellextrakten wurde dann anschließend sowohl der Gehalt an Insulin mittels Insulin-ELISA als auch die Proteinkonzentration bestimmt. In den Kontrollzellen konnte ein Insulingehalt von  $4,2 \pm 1,9$  ng/ $\mu$ g Protein und in Zellen mit Eny2-Suppression ein Wert für Insulin von  $4,4 \pm 1,6$  ng/ $\mu$ g Protein ermittelt werden (Abb. 3.21). Der gemessene Insulingehalt wies unter siRNA-vermittelter Suppression von Eny2 somit keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich mit den Kontrollzellen auf.



**Abb. 3.21: Der Insulingehalt in INS-1E-Zellen bleibt nach Eny2-Suppression unverändert.**

INS-1E-Zellen wurden mit entsprechender RNA inkubiert, anschließend gewaschen und homogenisiert und in den Homogenaten der Insulingehalt und auch die Proteinkonzentration ermittelt. n=3

### 3.2.3.6 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die intrazelluläre Kalzium-Konzentration

Ein entscheidendes Signal für die Exozytose insulinhaltiger Granula ist die Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Eliasson et al., 1997; Holz et al., 1995). Zur Analyse, wie sich eine Erniedrigung des Eny2-Niveaus in INS-1E-Zellen auf deren  $[Ca^{2+}]_i$ , sowohl während der glukoseabhängigen Insulinsekretion als auch nach Aktivierung der GLP-1-Rezeptorkaskade, auswirkt, wurden an ihnen  $Ca^{2+}$ -Imaging-Messungen durchgeführt. INS-1E-Zellen wurden für diesen Zweck auf Deckgläser ausgesät und entsprechend transfiziert. Nach einer Transfektionszeit von 72-96 Stunden wurden die Zellen dann jeweils eine halbe Stunde vor Versuchsdurchführung mit Fura-2-AM in glukosefreiem KRBH beladen. Nachdem die Zellen in die Versuchsanlage eingeführt und die Basislinie des  $Ca^{2+}$ -Signals in glukosefreiem KRBH aufgenommen wurde, erfolgte entweder die Zugabe von 2,8 mM oder 16,7 mM Glukose bzw. die Zugabe von 16,7 mM Glukose in Kombination mit 50 nM Ex-4. Die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde dann durch Messung der Veränderung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes, bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm, aufgenommen.

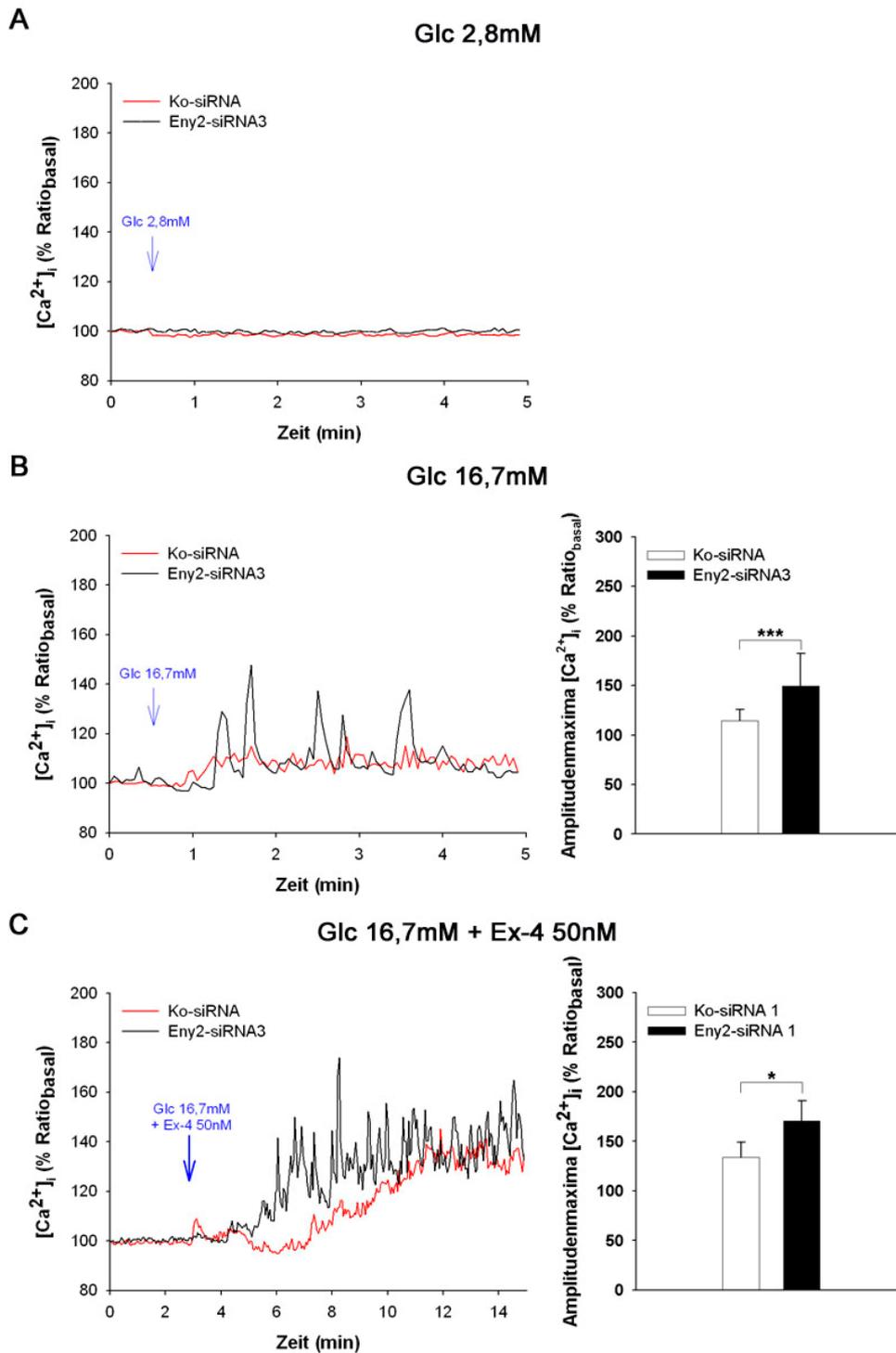
Für die in Abbildung 3.22 wiedergegebenen Ergebnisse wurde der Mittelwert des Verhältnisses  $F_{340nm}/F_{380nm}$  von mindestens 15 Einzelzellen pro Versuch gebildet. Trotz Hintergrundsubtraktion wichen die Ruhe- $Ca^{2+}$ -Signale der einzelnen Zellen innerhalb einer Population erheblich voneinander ab. Dieser Umstand erforderte es, die Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  prozentual auf das Ruhe- $Ca^{2+}$ -Signal zu normalisieren. Insgesamt war jedoch im Ruhe- $Ca^{2+}$ -Signal zwischen den beiden Zellpopulationen kein Unterschied feststellbar.

Eine Glukosekonzentration von 2,8 mM führte zu keiner erkennbaren Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ , weder in Kontrollzellen noch in Zellen mit Eny2-Suppression. Wie der Abbildung 3.22 A zu entnehmen, kam es nach Zugabe dieser basalen Glukosekonzentration zu einem

unveränderten, konvergenten Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Zellpopulationen. Dies war auch erwartet, da unter dieser Glukosekonzentration auch schon hinsichtlich der Insulinsekretion kein Unterschied zwischen diesen Zellen feststellbar war (vergleiche 3.2.3.2).

Unter dem Einfluss von 16,7 mM Glukose kam es, aufgrund der Inhibierung der  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ -Kanäle, zur Öffnung plasmamembranständiger, spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, was sich in steigenden  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , von sowohl Kontroll- als auch Eny2-supprimierten Zellen äußerte (Abb. 3.22 B). Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde dabei innerhalb einer Minute bewirkt und blieb während der gesamten Messdauer bestehen. Wie deutlich zu erkennen, führte 16,7 mM Glukose in Eny2-supprimierten Zellen zudem zu erheblichen periodischen Zunahmen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mit Amplitudenmaxima von  $149,31 \pm 32,94$  %  $\text{Ratio}_{\text{basal}}$  gegenüber den Zellen mit Kontrolltransfektion  $114,71 \pm 11,23$  %  $\text{Ratio}_{\text{basal}}$  ( $p=0,00006$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA3;  $n=3$  Versuche), was eine stärkere Beteiligung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher bei der Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in diesen Zellen indiziert.

Durch die Aktivierung der GLP-1-Rezeptorkaskade mittels 50 nM Ex-4 wurde die glukoseabhängige Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von Kontrollzellen und Zellen mit Eny2-Suppression noch verstärkt (Abb. 3.22 C). Auch nahmen die oszillationsartigen Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Eny2-supprimierten Zellen, vor allem in ihrer Amplitude, zu und erreichten Amplitudenmaxima von  $170,6 \pm 20,27$  %  $\text{Ratio}_{\text{basal}}$ . Demgegenüber erreichten die Amplitudenmaxima in den Kontrollzellen Werte von  $134,07 \pm 15,11$  %  $\text{Ratio}_{\text{basal}}$  ( $p=0,02$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA3;  $n=5$ ). Dieser Unterschied zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen lies sich auch optisch bei Betrachtung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wiedergegeben durch das Fluoreszenzsignal von Fura-2, feststellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Insbesondere während der Versuchsabläufe mit Hochglukose und Ex-4 ließ sich beobachten, dass nach Eny2-Suppression mehr Zellen pro Ausschnitt aktiv waren, diese höhere  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erreichten und dass die Oszillation ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale simultaner ablief.



**Abb. 3.22: Unter dem Einfluss der Eny2-Suppression kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration.**

INS-1E-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit entsprechender siRNA transfiziert, nach 72-96h Fura-2-AM beladen und die intrazelluläre Kalziumkonzentration über die Bestimmung der Fluoreszenzratio der Wellenlängen 340 nm und 380 nm ermittelt. A) Unter basaler Glukosekonzentration bestand kein Unterschied in der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen. B) Bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM zeigten Eny2-supprimierte Zellen eine deutlich höhere periodische Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  mit signifikant erhöhten Amplitudenmaxima. C) Unter dem Einfluss von Ex-4 bei simultan hoher Glukose war die in B gezeigte Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  und der Amplitudenmaxima deutlich verstärkt. Dargestellt sind jeweils die gemittelten Werte von mindestens 15 Zellen pro Versuch. Glc, Glukose; Ex-4, Exendin-4; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 5$  für jeden Stimulus.

### 3.2.3.7 Einfluss extrazellulären Kalziums auf die gesteigerte glukose- und inkretin-abhängige Insulinsekretion nach siRNA vermittelter Suppression von Eny2

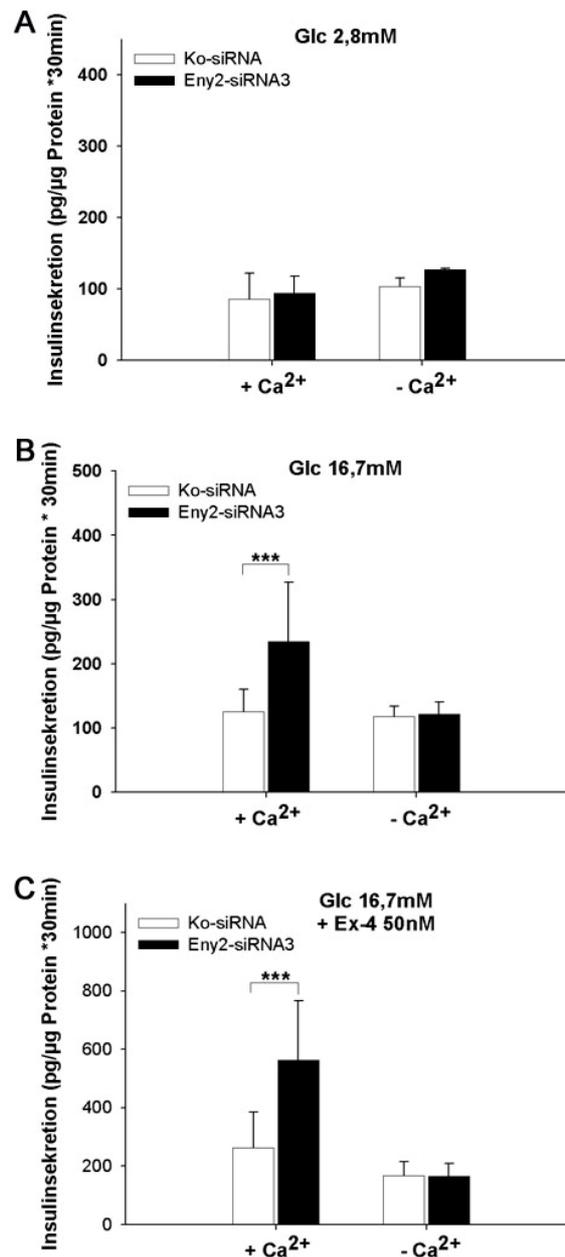
In pankreatischen  $\beta$ -Zellen wird sowohl während der glukoseinduzierten als auch der inkretinvermittelten Sekretion von Insulin, die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zunächst durch den Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellularraum herbeigeführt (Lang, 1999). Welchen Einfluss die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration dabei auf die durch Eny2-Suppression gesteigerte glukose- und inkretinabhängige Insulinsekretion hat, sollte nachfolgend untersucht werden. INS-1E-Zellen wurden dafür entsprechend transfiziert und nach einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden wurden an ihnen Insulinsekretions-Assays bei basaler (2,8 mM) und hoher (16,7 mM) Glukosekonzentration sowie bei 16,7 mM Glukose in Kombination mit 50 nM Ex-4, mit und ohne extrazellulärem  $Ca^{2+}$ , durchgeführt.

Wie der Abbildung 3.23 A zu entnehmen, hatte ein Fehlen des extrazellulären  $Ca^{2+}$  unter basalen Glukosebedingungen keine wesentlichen Auswirkungen auf die Insulinsekretion von Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen. Für Kontrollzellen wurde mit  $Ca^{2+}$  ein Insulinsekretionswert von  $85,85 \pm 36,02$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min und ohne  $Ca^{2+}$  ein Wert von  $103,18 \pm 11,91$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min ermittelt. Für Zellen mit Eny2-Suppression wurden unter denselben Bedingungen Werte von  $94,32 \pm 23,3$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min bzw.  $126,29 \pm 2,11$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min gemessen. Damit besteht zwischen den INS-1E-Zellen mit unterschiedlichem Niveau an Eny2, auch unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen, bei basaler Glukosekonzentration kein nennenswerter Unterschied bezüglich ihrer Insulinsekretion. Dies war auch erwartet, da, wie schon im vorhergehenden Abschnitt gezeigt (3.2.3.7), bei basaler Glukosekonzentration kein  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zellen erfolgte und auch bisher kein signifikanter Unterschied in der Insulinsekretion nachgewiesen werden konnte (3.2.3.2).

Bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM kam es hingegen unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen bei Zellen mit Eny2-Suppression zu einem signifikanten Abfall der Insulinsekretion von  $234,88 \pm 91,83$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min (mit  $Ca^{2+}$ ) auf  $121,52 \pm 19,07$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min (Abb. 3.23 B;  $p=0,03$  vs.  $+Ca^{2+}$ ;  $n=3$ ). Für Kontrollzellen konnte dagegen nur ein unwesentlicher Rückgang des Insulinsekretionswertes verzeichnet werden. Bei diesen Zellen wurde mit  $Ca^{2+}$  ein Wert von  $125,33 \pm 35,16$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min und ohne  $Ca^{2+}$  ein Wert von  $117,62 \pm 16,4$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min ermittelt. Die signifikante Differenz in der glukoseabhängigen Insulinsekretion die zwischen beiden Zellpopulationen mit unterschiedlichem Niveau an Eny2 in Anwesenheit extrazellulären  $Ca^{2+}$  besteht, war somit unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen nicht mehr nachweisbar.

Ähnliches lies sich für die inkretinvermittelte Insulinsekretion feststellen. Ein Fehlen des extrazellulären  $Ca^{2+}$  bewirkte in Kontrollzellen, und noch deutlicher ausgeprägt in Zellen mit verminderter Eny2-Expression, einen Rückgang der Insulinsekretion um 36 % von  $262,51 \pm 123,17$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min auf  $168,57 \pm 46,21$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min für Kontroll-

bzw. um 71 % von  $562,54 \pm 204,38$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min auf  $164,7 \pm 44,29$  pg/ $\mu$ g Protein \*30 min für Eny2-supprimierte Zellen. Folglich ist das extrazelluläre  $Ca^{2+}$  auch für die Aufrechterhaltung des signifikanten Unterschiedes in der inkretinvermittelten Insulinsekretion zwischen Kontrollzellen und Zellen mit Eny2-Suppression essentiell.

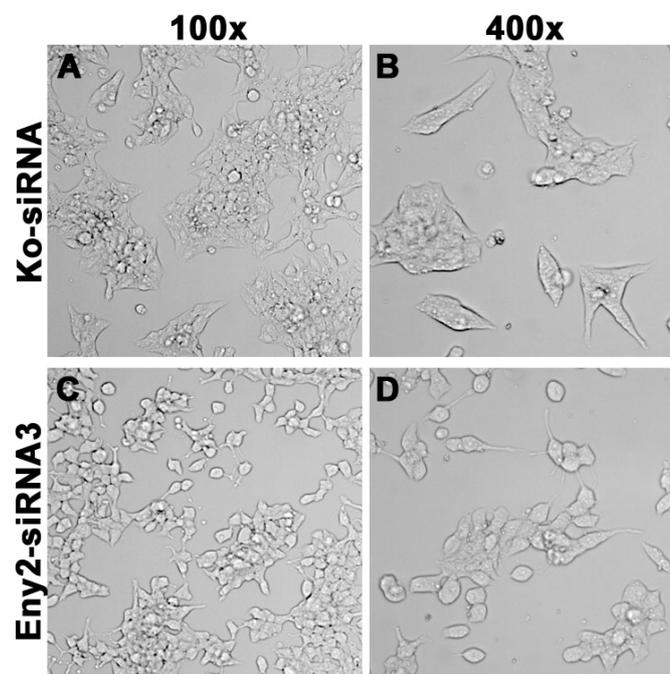


**Abb. 3.23: Der Einfluss der Eny2-Suppression auf die glukose- und inkretinvermittelte Insulinsekretion ist abhängig vom extrazellulären Kalzium.**

INS-1E-Zellen wurden mit Kontroll-, bzw. Eny2-siRNA behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72-96 h wurden mit ihnen Insulinsekretionen mit und ohne extrazellulärem Kalzium durchgeführt. A) Extrazelluläres  $Ca^{2+}$  hat keinen Einfluss auf die basale Insulinsekretion von sowohl Kontroll- als auch Eny2-supprimierten Zellen, während der Unterschied der B) glukose- und auch C) inkretinabhängigen Insulinsekretion durch ein Fehlen von  $Ca^{2+}$  im Extrazellulärraum verloren geht. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Experimenten. Glc, Glukose; Ex-4, Exendin-4; \*\*\* $p < 0,001$

### 3.2.3.8 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Morphologie und das Zytoskelett von INS-1E-Zellen

Die Morphologie von Zellen ist vielen Zusammenhängen bedeutend. In Zellkulturen beispielsweise, kann man unter anderem von der Morphologie auf den Differenzierungsstatus, aber auch auf die Gesundheit der Zellen schließen. Betrachtete man lichtmikroskopisch mit Durchlicht INS-1E-Zellen nach siRNA vermittelter Suppression von Eny2 (Abb. 3.24) so fielen bei ihnen im Vergleich mit Kontrollzellen deutliche morphologische Veränderungen auf. Sie sahen abgerundeter aus und auch die Zellausläufer erschienen wesentlich schmäler. Zudem ließen sich im Zellverband die einzelnen Zellen besser optisch von einander differenzieren.



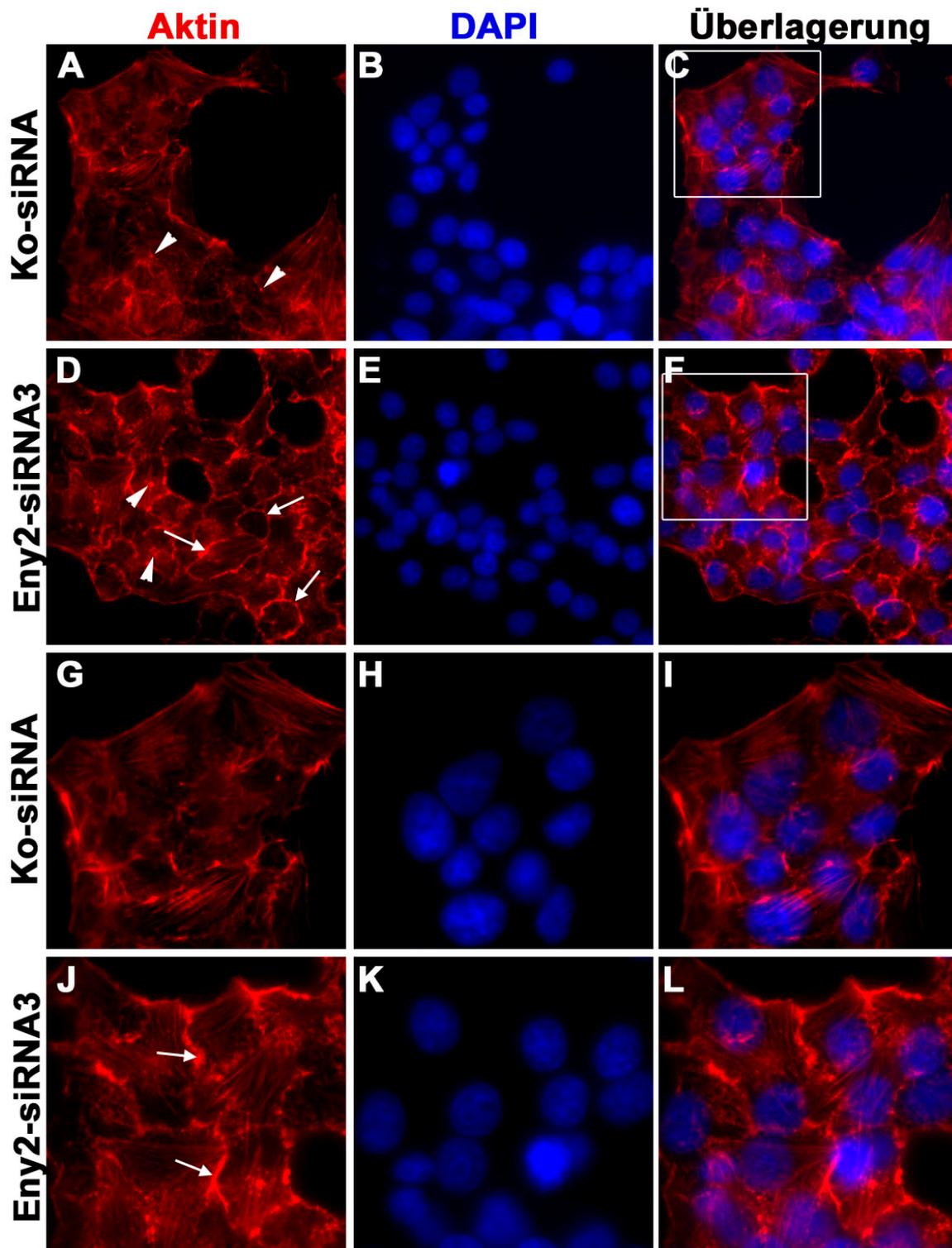
**Abb. 3.24: Eny2-Suppression führt zu Veränderungen in der Morphologie von INS-1E-Zellen.** Nach 72 h reverser Transfektion ließen Eny2-supprimierte Zellen bei lichtmikroskopischer Betrachtung im Vergleich mit kontroll-transfizierten Zellen morphologische Veränderungen erkennen.

Die Gestalt einer Zelle wird durch das Zytoskelett, v.a. aber durch das Aktin-Zytoskelett bestimmt. Das Aktin-Zytoskelett ist ein äußerst kompliziertes Gebilde. Es stabilisiert nicht nur die äußere Form einer Zelle, sondern ist vielmehr auch zur Fixation bestimmter Zellstrukturen, für die Signalübertragung zwischen Zellen sowie für Bewegungen und Transport innerhalb der Zelle verantwortlich. Die Aktinfilamente des Aktin-Zytoskeletts interagieren, neben anderen Proteinen, auch mit speziellen Motorproteinen, den Myosinen. Die Aktin-Myosin-Interaktion ist von großer Bedeutung für den aktiven, gerichteten intrazellulären Transport, wie z.B. von Membranvesikeln und stellt somit auch eine

wesentliche Komponente für die geregelte Exocytose der Insulinsekretgranula entsprechender Zellen dar (Iida et al., 1997; Li et al., 1994).

Mittels Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts sollte nun geklärt werden, ob sich die oben beschriebenen Veränderungen der äußeren Morphologie Eny2-supprimierter INS-1E-Zellen auch auf intrazellulärer Ebene, dem Aktin-Zytoskelett, widerspiegeln. Dazu wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Alexa 546-konjugierten Phalloidin angefärbt. Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), lagert sich an die Aktinfilamente und kann demzufolge, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, zum Nachweis dieses filamentösen F-Aktin eingesetzt werden. Zur Markierung der Kerne diente Dapi. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25 zusammengestellt.

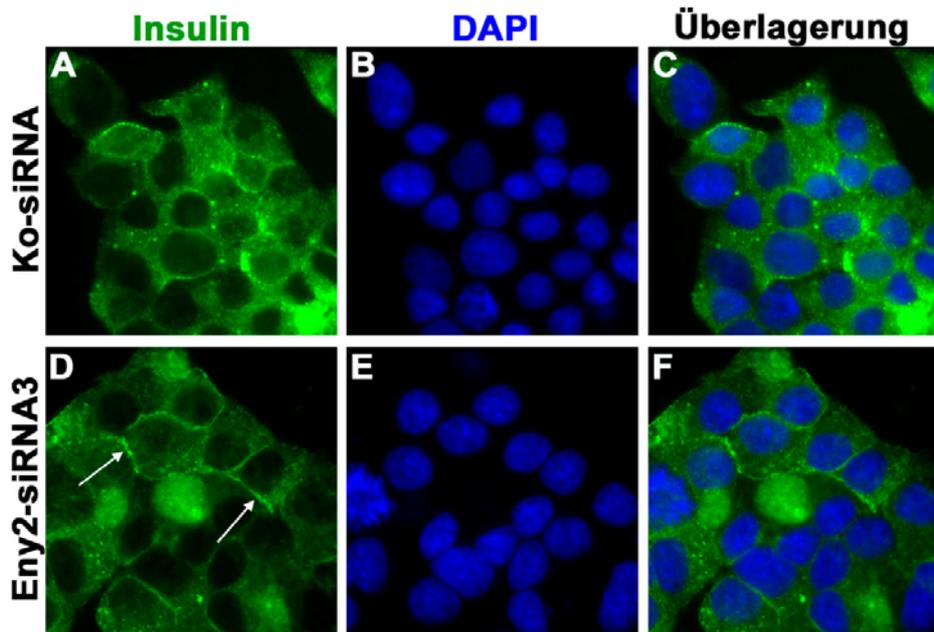
Bei der Betrachtung des Aktin-Zytoskeletts sowohl von Kontroll-Zellen, als auch Zellen mit Eny2-Suppression, fiel das Vorhandensein von dicken Fasern auf. Es handelt sich dabei um Bündel von langen, parallel angeordneten Aktinfilamenten, die in sogenannten Stressfasern organisiert sind und die Zelle vom einen zum entgegengesetzten Pol durchziehen. Sie sind in bestimmten Regionen der Plasmamembran verankert (Ridley and Hall, 1992). Diese Regionen sind zum einen die Adherens Junctions, die der Verbindung der Aktinfilamente benachbarter Zellen dienen (Geiger et al., 1985) und zum anderen die fokalen Adhäsionen, die das Aktin-Zytoskelett mechanisch mit der extrazellulären Matrix bzw. dem Substratraum verbinden (Zaidel-Bar et al., 2004; Zamir and Geiger, 2001; Zimmerman et al., 2004). Diese letzt genannten „Startbereiche“ der Aktinfasern waren auch bei den Kontroll- und Eny2-siRNA3 behandelten Zellen zu erkennen (Abb. 3.25 Pfeilspitzen in A und D). Darüber hinaus war in den Zellen mit verminderter Expression von Eny2 eine größere Verdichtung des Aktins an den Zell-Zell-Kontakten erkennbar. Dadurch zeigte sich auch fluoreszenzmikroskopisch, wie schon im Durchlicht, eine eindeutigere Abgrenzung der einzelnen Zellen.



**Abb. 3.25: Eny2-Suppression führt in INS-1E-Zellen scheinbar zur Verdichtung des Aktin-Zytoskeletts entlang der Zellgrenzen.**

INS-1E-Zellen wurden auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausgesät und transient mit entsprechender siRNA transfiziert, nach 72 h Inkubation fixiert und anschließend das Aktin durch konjugiertes Phalloidin und die Kerne durch Dapi markiert. Es zeigte sich bei Eny2-supprimierten Zellen, beim Vergleich mit entsprechenden Kontrollen, eine scheinbar größere Verdichtung des Aktins entlang der Zellgrenzen (Pfeile in D und J). Die Pfeilspitzen in A und D weisen auf die Fokal-Adhäsionen, den „Startbereichen“ der Aktinfasern, hin. G-I zeigen die vergrößerten Darstellungen der Ausschnitte in C bzw. F. A-F: Vergrößerung 100x, G-L Vergrößerung 100x, digitaler Zoom 4x

Wie oben angeführt, ist das Aktin-Zytoskelett maßgeblich am Transport insulinhaltiger Vesikel beteiligt. Durch eine Doppelmarkierung des Insulin und des Aktins in INS-1E-Zellen sollte geprüft werden, ob eventuell die Verdichtung des Aktins in Nähe der Zellgrenzen, nach Eny2-Suppression, auch mit einer erhöhten Insulindichte in diesen Bereichen einhergeht. Für die Färbung stand lediglich ein unkonjugierter monoklonaler Aktin-Antikörper zur Verfügung, der für nicht in Paraffin eingebettete Gewebe bzw. Zellen nicht ausgetestet war. Dementsprechend suboptimal war auch das Färbeergebnis. Trotz verschiedener Optimierungsversuche gelang es nicht, das Aktin hinreichend zur Klärung der obigen Frage darzustellen. Daher ist in der Abbildung 3.26 nur Insulin mit Dapi gefärbten Kernen abgebildet. Die Bilder A und D zeigen die Insulinmarkierung, B und E die Dapi-markierten Kerne und C und F die Überlagerung der beiden Markierungen der Zellen. Ein Vergleich der Insulinmarkierung von Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen (A und D in Abb. 3.26) zeigt, dass es keine gravierenden Unterschiede hinsichtlich der Konzentration des Insulins in den beiden unterschiedlich behandelten Zellen zu geben scheint, was konform zu den Ergebnissen der Bestimmung des Insulingehalts wäre (3.2.3.6). Eine genauere Betrachtung der Insulinmarkierung legt zudem nahe, dass auch Insulin, wie zuvor schon für Aktin gezeigt, in Zellen mit Eny2 Suppression, eine höhere Konzentration entlang der Zellgrenzen aufzuweisen scheint. Ob dies ein Phänomen siRNA-vermittelter Suppression von Eny2 in INS-1E-Zellen ist oder lediglich verschiedene Ebenen von Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen mikroskopisch aufgezeichnet wurden, könnte eine Darstellung der Zellen mittels konfokalem LSM klären. Hierdurch wäre die räumliche Erfassung zellulärer Strukturen möglich, die zusätzlich mit qualitativen und quantitativen Messdaten unterlegt werden könnten. Mit einer geeigneten Doppelfärbung von Insulin und Aktin könnte so eventuell die obige Frage in einer entsprechenden Ko-Lokalisationsstudie, geklärt werden.



**Abb. 3.26:** Die Suppression von Eny2 in INS-1E-Zellen hat scheinbar keine Auswirkung auf deren Insulin-Gehalt.

INS-1E-Zellen wurden auf Gelatine-beschichtete Deckgläser ausgesät und entweder mit Kontroll- oder mit Eny2-siRNA behandelt. Nach 72 h erfolgten die Fixierung und eine anschließende Immunmarkierung des Insulins mit entsprechendem AK. Die Kerne wurden mittels Dapi visualisiert. Im Vergleich mit kontroll-transfizierten Zellen zeigte sich keine offensichtliche Veränderung im Insulingehalt. Jedoch zeigte sich mit dieser Darstellung eine Konzentration der Insulins entlang der Zellgrenzen (Pfeile in D). Vergrößerung 100x

### 3.2.3.9 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Glukose-Metabolismus von INS-1E-Zellen

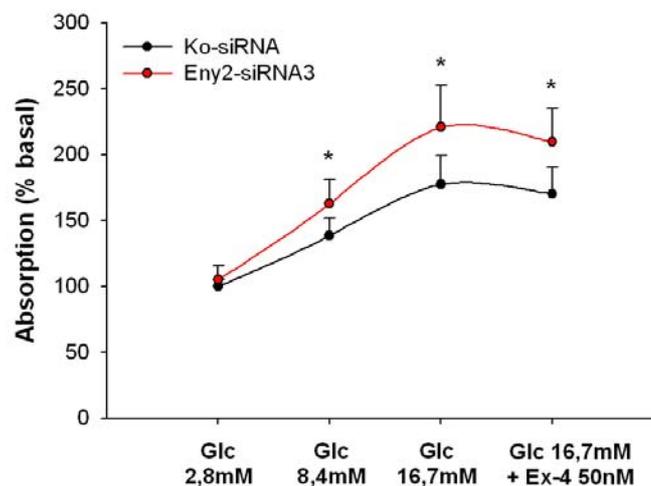
Der effektivste Reiz zur Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen ist die Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration (Matschinsky, 1996). Dabei ist die Stärke der Insulinsekretion bis zu einem bestimmten Punkt abhängig von der Glukosekonzentration im Extrazellulärraum und vor allem auch von deren Verstoffwechslung in der  $\beta$ -Zelle.

Wie sich eine Suppression von Eny2 auf den Glukosestoffwechsel von INS-1E-Zellen auswirkt, sollte mittels MTT-Assay bestimmt werden. MTT wird durch die, bei der Glykolyse und dem mitochondrialen Metabolismus entstehenden, Pyrimidinnukleotide NADH und NADPH und zu einem kleinen Teil auch durch das, in den Mitochondrien durch Succinat-Dehydrogenase gebildete, Succinat reduziert. Aus dem gelben MTT entsteht so ein blau-violettes Formazan. Die Bildung des Formazans ist demzufolge abhängig vom Glukosemetabolismus und zu einem geringen Anteil auch von der mitochondrialen Respiration und kann folglich auch zur Messung des Glukosestoffwechsels herangezogen werden (Berridge and Tan, 1993; Berridge, 1996; Janjic and Wollheim, 1992).

Mit siRNA behandelte INS-1E-Zellen wurden nach einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden gewaschen und mit KRBH, der unterschiedliche Konzentrationen an Glukose

enthielt sowie mit MTT-Reagenz inkubiert. Die Bildung des blau-violetten Formazans wurde dann photometrisch durch Messung der Absorption bestimmt.

Unter basalen Glukosebedingungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen mit Eny2-Suppression (Abb. 3.27). Stieg jedoch die Glukosekonzentration an, stieg sowohl in Kontroll- als auch in Eny2-supprimierten Zellen auch die Bildung des Formazans. Infolge der Eny2-Suppression wurden jedoch signifikant höhere Anstiege der Formazanproduktion gemessen. Während es bei den Kontrollzellen, bei einer Glukosekonzentration von 8,4 mM, zu einem 1,4-fachen Anstieg, auf  $138,45 \pm 13,38$  % kam, betrug der Anstieg in Zellen mit Eny2-Suppression bei dieser Glukosekonzentration das 1,6-fache und stieg von  $104,96 \pm 10,38$  % auf  $162,81 \pm 18,5$  % ( $p=0,04$  Ko vs. Eny2-siRNA3;  $n=3$ ). Bei 16,7 mM Glukosekonzentration war der Unterschied im Anstieg zwischen Kontroll- und Testzellen noch größer. Bei dieser Glukosekonzentration konnte für die Kontrollzellen eine Steigerung der Formazanproduktion um das 1,8-fache und für Eny2-supprimierte Zellen sogar auf das 2,1-fache ermittelt werden. In Kontrollzellen stieg die Absorption als Folge der Formazanbildung auf  $177,44 \pm 21,49$  % und in Zellen mit Eny2-Suppression auf  $220,72 \pm 31,63$  % ( $p=0,03$  Ko vs. Eny2-siRNA3;  $n=3$ ). Die zusätzliche Gabe von 50 nM Ex-4 bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM bewirkte keine weitere Steigerung hinsichtlich der Formazanbildung gegenüber 16,7 mM Glukose allein. Jedoch zeigten auch hier Eny2-supprimierte Zellen eine deutlich höhere glukoseabhängige metabolische Aktivität. Für Kontrollzellen betrug hier der Anstieg das 1,7-fache und für Eny2-supprimierte Zellen das 2,0 fache gegenüber basal ( $p=0,02$  Ko vs. Eny2-siRNA3;  $n=3$ ).



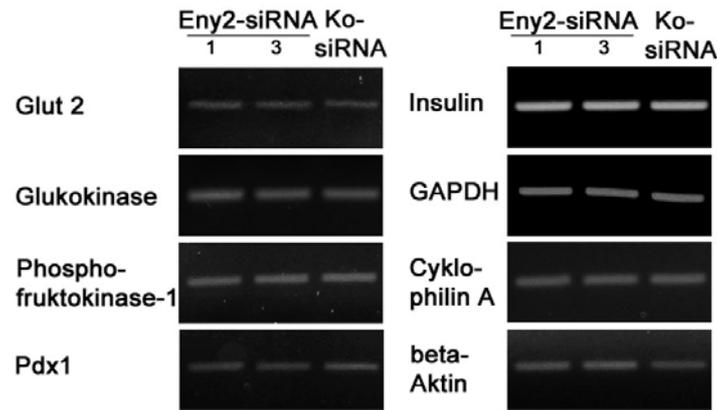
**Abb. 3.27: Eine Unterdrückung der Eny2-Expression führt bei höheren Glukosekonzentrationen zu einer Steigerung des Glukosemetabolismus.**

Der Glukosestoffwechsel siRNA behandelter Zellen wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Die INS-1E-Zellen wurden dafür nach einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden mit MTT-Reagenz und verschiedenen Glukosekonzentrationen inkubiert und die Bildung des Formazans photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 3.2.3.10 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die Expression zentraler Gene der Insulinsekretion

Wie unter 3.2.3.10 geschildert, führte eine Eny2-Suppression in INS-1E-Zellen zu einer gesteigerten glukoseabhängigen metabolischen Aktivität. Der Glukoseumsatz in der Zelle ist dabei abhängig vom Zusammenwirken der Glukoseaufnahme und Glukoseverstoffwechslung. Die Glukoseaufnahme in den  $\beta$ -Zellen erfolgt über das Glukosetransportprotein (Glut2 bei Nagern). In den Zellen wird die Glukose dann über den Glykolyseweg metabolisiert. Als Schlüsselenzym für diesen Stoffwechselweg gilt das glukosephosphorylierende Enzym Glukokinase (Froguel et al., 1993; Grupe et al., 1995). Ebenso wird im Zusammenhang mit der Glykolyse auch der Phosphofruktokinase-1, welche Fruktose-6-phosphat zu Fruktose-1,6-phosphat umsetzt, eine zentrale Rolle zugeschrieben (Perna et al., 1991). Sowohl die Expression des Glukosetransportproteins als auch die Expression der Glukokinase stehen unter der Kontrolle von Pdx1 (Stanojevic et al., 2004). Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Pdx1 ist darüber hinaus auch für die Entwicklung des gesamten Pankreas und auch für die Biosynthese des Insulins essentiell (Offield et al., 1996; Petersen et al., 1994).

Ob die Suppression von Eny2 eventuell die Expression der genannten Glykolyseenzyme, die Expression des Glukosetransportproteins Glut2 oder aber die Expression des Insulins oder Pdx1 beeinflusst, sollte mittels Expressionsanalysen geklärt werden. Dafür wurden INS-1E-Zellen revers entweder mit Kontroll-siRNA oder mit Eny2-siRNA transfiziert. Nach 72-96 Stunden erfolgte dann die RNA-Isolation und eine sich anschließende semiquantitative rtPCR mit entsprechenden Primern. Für die Quantifizierung der einzusetzenden cDNA-Mengen diente wieder die Expression des Haushaltsgens GAPDH. Da aber auch Haushaltsgene in einem gewissen Maße rauf- und runterreguliert werden können (Souaze et al., 1996) und nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, dass eine Suppression von Eny2 keine Auswirkungen auf die Expression der GAPDH nach sich zieht, wurde die Expression von zwei weiteren Haushaltsgenen,  $\beta$ -Aktin und Cyklophilin-A, untersucht.  $\beta$ -Aktin ist, wie bereits unter 3.2.3.9 beschrieben eine Komponente des Zytoskeletts. Cyklophilin-A ist ein ebenfalls ubiquitär exprimiertes Protein mit Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität und sollte ebenfalls kaum Expressionsschwankungen unterliegen. Die Abbildung 3.28 zeigt das Ergebnis dieser Expressionanalysen. Bei einem Vergleich der Bandenintensitäten von Kontrollzellen und Zellen mit siRNA-vermittelter Suppression von Eny2 konnte bei den von uns untersuchten Genen kein Unterschied hinsichtlich der Expression auf mRNA-Niveau festgestellt werden.



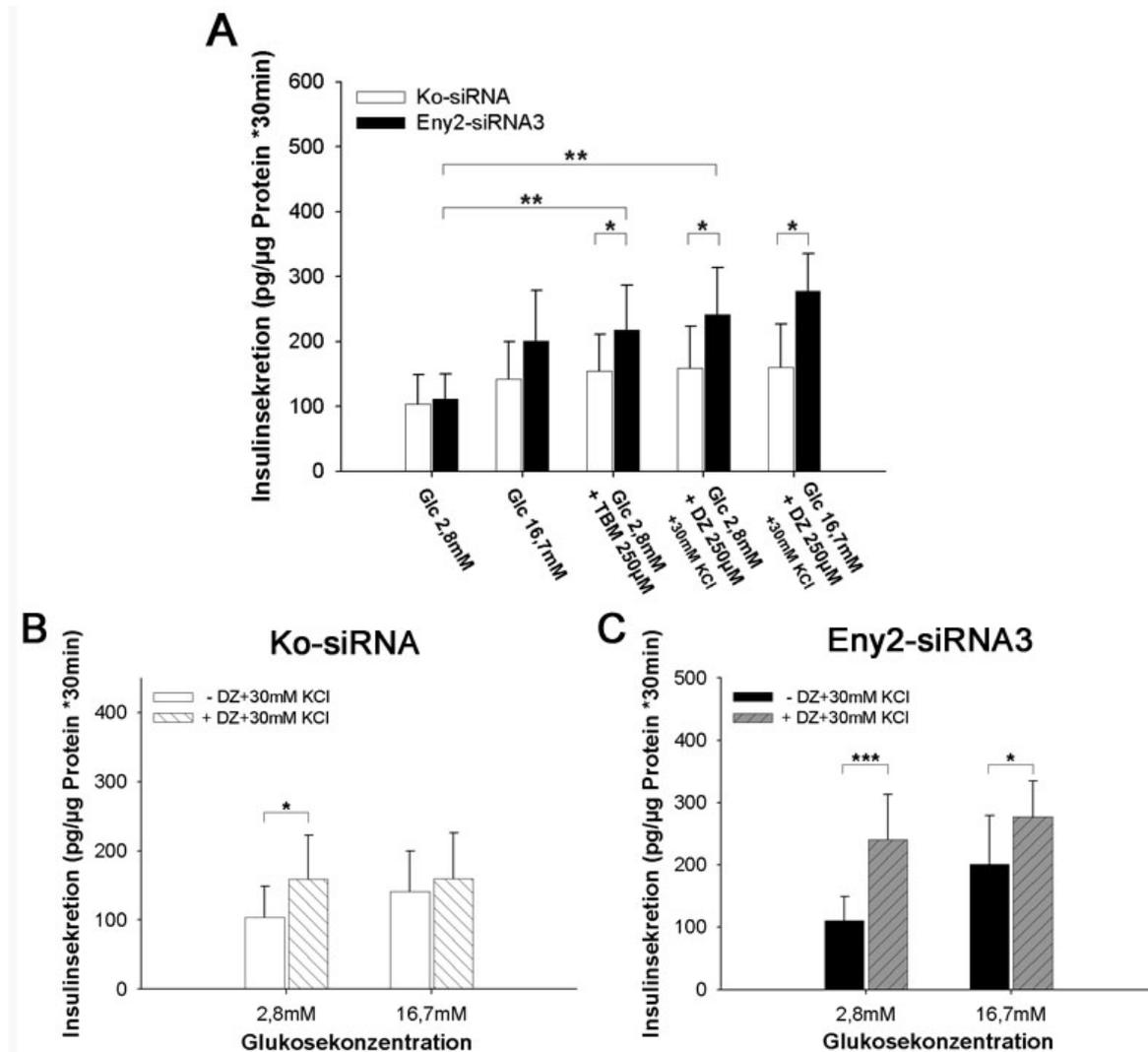
**Abb. 3.28: Die Expression zentraler Gene der Insulinsekretion zeigt keinen signifikanten Unterschied nach Eny2 Suppression.**

INS-1E-Zellen wurden mit entsprechender siRNA behandelt, 72-96 h später die mRNA isoliert und eine semiquantitative rtPCR durchgeführt. Aufgrund der gleichen Bandenstärke, ließ sich ein offensichtlicher Einfluss einer Eny2-Suppression auf die genannten Gene ausschließen. Die Quantifizierung der einzusetzenden cDNA-Menge fand mittels GAPDH statt.

### 3.2.3.11 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf den Triggering- und Metabolic Amplifying Pathway

Die glukoseinduzierte Insulinsekretion wird hauptsächlich über zwei Wege (Pathways) kontrolliert, die beide vom Glukosestoffwechsel der  $\beta$ -Zelle abhängen (Gembal et al., 1992; Henquin, 1995; Sato et al., 1998). Der so genannte Triggering-Pathway beginnt mit dem Schließen ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle in der Plasmamembran der  $\beta$ -Zelle durch die glukoseabhängige Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses (Ashcroft and Gribble, 1999; Rorsman, 1997). Dies ruft eine Depolarisation der  $\beta$ -Zelle hervor infolgedessen sich spannungsregulierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen. Der Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wiederum ist der Auslöser für die gesteigerte Exozytose der insulinhaltigen Granula. Ebenso aktiviert Glukose den so genannten Metabolic-Amplifying-Pathway. Über diesen Weg kommt es durch, bis dato nicht genau geklärte Mechanismen, zu einer Verstärkung der sekretorischen Antwort, ohne direkte Beteiligung der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle, und ohne dass eine weitere Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  induziert wird (Sato et al., 1999; Sato and Henquin, 1998). Für die Untersuchung eines möglichen Einfluss einer Eny2-Suppression auf die beiden genannten Hauptwege der glukoseabhängigen Insulinsekretion machten wir uns die Eigenschaften zweier Verbindungen, Tolbutamid (TBM) und Diazoxid (DZ) zu nutze, die beide mit der SUR1-Untereinheit der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle interagieren. Während TBM unabhängig vom Glukosestoffwechsel zu einem Verschluss der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle führt, hat DZ den gegensätzlichen Effekt. Es bewirkt eine Öffnung der  $K^+_{ATP}$ -Kanäle. Zusammen mit depolarisierenden extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen können so die Effekte von Glukose auf die Insulinsekretion, unabhängig von der  $K^+_{ATP}$ -Kanalaktivität untersucht werden.

An mit entsprechender siRNA behandelten Zellen wurden, nach einer Transfektionsdauer von 72-96 Stunden, Insulinsekretionsmessungen, bei basaler (2,8 mM) bzw. hoher (16,7 mM) Glukose, in Ab- bzw. Anwesenheit von entweder 250  $\mu$ M TBM oder 250  $\mu$ M DZ in Verbindung mit 30 mM KCl, durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 3.29 dargestellt.



**Abb. 3.29: Unter dem Einfluss der Sulfonylharnstoffe TBM und DZ zeigen INS-1E-Zellen mit siRNA vermittelter Suppression von Eny2 höhere glukoseabhängige Insulinsekretionswerte.**

INS-1E-Zellen wurden mit Ko-siRNA bzw. Eny2-siRNA3 transfiziert. Nach 72-96 h wurden die Zellen gewaschen und Insulinsekretionsmessungen bei basaler bzw. Hoch-Glukosekonzentration mit und ohne TBM bzw. DZ in Kombination mit 30 mM KCl durchgeführt. A) Im Vergleich mit den Kontrollzellen zeigten sich bei Zellen mit Eny2-Suppression unter dem Einfluss von TBM und DZ schon unter basalen Glukosebedingungen signifikant höhere Insulinsekretionswerte. B) und C) Genauere Darstellung des Effekts von DZ+30 mM KCl bei entsprechender Glukosekonzentration auf Kontroll- (B) bzw. Eny2-supprimierte Zellen (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 5 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Die Signifikanzen in A) wurden unter Hinzunahme der einfaktoriellen ANOVA und anschließend Bonferroni-Post-hoc-Test ermittelt. Die Daten in (B) und (C) wurden unter Benutzung des ungepaarten t-Test miteinander verglichen.

Unter basaler (2,8 mM) Glukosekonzentration war kein signifikanter Unterschied in der Insulinsekretion zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen erkennbar (103,74±45,4 bzw. 110,85±38,75 pg/µg Protein \*30 min). Unter hoher (16,7 mM) Glukosekonzentration stieg zwar die Insulinsekretionsrate in Eny2-supprimierten Zellen wesentlich stärker an (201,01±77,89 pg/µg Protein \*30 min) als in Kontrollzellen (141,43±58,49 pg/µg Protein \*30 min), jedoch war dieser Unterschied im Falle dieses Experimentes, aufgrund der doch sehr hohen Standardabweichungen, nicht signifikant.

Wie zu erwarten, kam es unter dem Einfluss von 250 µM des Kanal-Inhibitors TBM bei basaler Glukosekonzentration zu einem Anstieg der Insulinsekretionswerte auf das Niveau hoher 16,7 mM Glukosekonzentration (Abb. 3.29 A). Für Kontrollzellen konnte unter diesen Bedingungen ein Insulinsekretionswert von 153,78±57,11 pg/µg Protein \*30 min ermittelt werden. Für Eny2-supprimierte Zellen fiel dieser Anstieg signifikant höher aus. Es wurde ein Insulinsekretionswert von 217,84±69,04 pg/µg Protein \*30 min ( $p=0,006$  vs. Glc 2,8 mM;  $p=0,04$  Ko vs. Eny2-siRNA3) bestimmt. Dieses Ergebnis indiziert, dass auch Metabolismus-distale, ATP-unabhängige Mechanismen durch einen Eny2-Knockdown beeinflusst werden und so zur gesteigerten glukoseabhängigen Insulinsekretion beitragen.

Wie sich die Eny2-Suppression in INS-1E-Zellen auf den Metabolic-Amplifying-Pathway auswirkt, wurde, wie schon erwähnt, mittels des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanal-Öffners DZ kombiniert mit 30 mM KCl untersucht. Unter basalen Glukosebedingungen bewirkte DZ einen Anstieg des Insulinsekretionswertes in Kontrollzellen auf 159,14±63,7 pg/µg Protein \*30 min ( $p=0,048$  vs. Glc 2,8 mM; Abb. 3.29 B). Ein deutlich höherer Wert wurde unter diesen Bedingungen bei Zellen mit Eny2-Suppression ermittelt (Abb. 3.29 C). In diesen Zellen wurde ein Insulinsekretionswert von 240,79±72,56 pg/µg Protein \*30 min gemessen ( $p=0,003$  vs. Glc 2,8 mM;  $p=0,02$  Ko vs. Eny2-siRNA3). Eine Erhöhung der Glukosekonzentration auf 16,7 mM führte unter diesen experimentellen Bedingungen zu keiner weiteren Steigerung der Insulinsekretionsraten, weder bei Zellen mit Kontrolltransfektion (159,73±66,5 pg/µg Protein \*30 min) noch bei Zellen mit siRNA-vermittelter Suppression von Eny2 (276,89±57,84 pg/µg Protein \*30 min), was auf eine nur eingeschränkte Beteiligung der Faktoren des Metabolic-Amplifying-Pathways an der glukoseinduzierten Insulinsekretion in diesen Zellen hindeutet. Bei Betrachtung der Diagramme B und C in Abbildung 3.29 ist allerdings anzumerken, dass gegenüber den Kontrollzellen eine Suppression von Eny2 unter dem Einfluss von DZ bei Hochglukose signifikant höhere Insulinsekretionswerte bewirkte, als eine hohe Glukosekonzentration allein ( $p=0,03$ ).

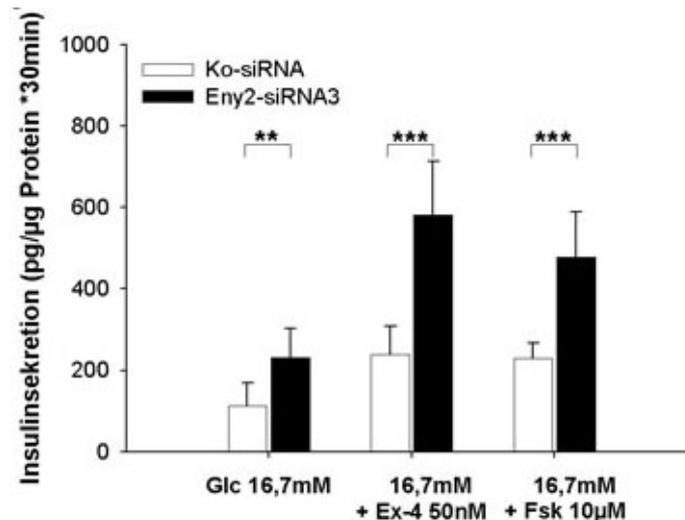
### 3.2.3.12 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf zentrale Elemente der inkretinvermittelten Signaltransduktion

Wie bereits unter 3.2.3.3 aufgezeigt, ist nach Eny2-Suppression in INS-1E-Zellen die inkretinvermittelte Insulinfreisetzung, hervorgerufen durch Exendin-4, ebenso charakteristisch wie die glukoseabhängige Insulinsekretion bei hohen Glukosekonzentrationen. So genannte Inkretine, wie GIP, GLP-1 und dessen Agonist Ex-4 binden an spezifische Transmembranrezeptoren der  $\beta$ -Zelle und stimulieren die Insulinfreisetzung so über die Aktivierung des Adenylatzyklasesystems (Mojsov et al., 1987). Im Folgenden sollte daher untersucht, welche Komponente oder Komponenten des AC-Signalweges potentiell durch Eny2 moduliert werden könnten.

#### ***Stimulation der Adenylatzyklase***

Ob sich eventuell Rückschlüsse darauf ziehen lassen, dass der GLP-1 Rezeptor selbst durch die Expression von Eny2 beeinflusst wird und daher eine Ursache für die gesteigerte inkretinabhängige Insulinsekretion nach Eny2-Supprimierung darstellt, sollte in einem ersten Schritt durch Aktivierung der Adenylatzyklase, bei Umgehung der Rezeptorebene, überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde der unspezifische AC-Aktivator Forskolin eingesetzt.

Nachdem INS-1E-Zellen mit entsprechender siRNA inkubiert wurden, führten wir mit ihnen Insulinsekretionsmessungen unter der Wirkung von 10  $\mu$ M Forskolin, bzw. zum Vergleich auch mit 50 nM Exendin-4, bei hoher Glukosekonzentration (16,7 mM) durch. Wie in Abbildung 3.30 erkennbar, kam es nach der Inkubation der Zellen mit Forskolin zu einem deutlichen Anstieg der Insulinsekretionswerte. Während sich die Sekretionsrate in Kontrollzellen um 115 % von  $106,9 \pm 9,56$  auf  $229,58 \pm 38,06$  pg/ $\mu$ g Protein\*30 min erhöhte ( $p=3,67 \cdot 10^{-8}$  vs. Glc16,7 mM), konnte in Eny2-supprimierten Zellen nach Inkubation mit Forskolin eine um 142 % gesteigerte Insulinsekretion gemessen werden. In diesen Zellen stieg die Sekretion von Insulin durch die Aktivierung der AC von  $204,12 \pm 53,78$  pg/ $\mu$ g Protein\*30 min auf  $478,47 \pm 111,12$  pg/ $\mu$ g Protein\*30 min ( $p=2,96 \cdot 10^{-6}$  vs. Glc16,7 mM  $p=5,46 \cdot 10^{-6}$  Ko vs. Eny2-siRNA3; n=5) Unter dem Einfluss von Ex-4 konnten wir unter diesen Bedingungen einen Anstieg der Insulinsekretion in den Kontrollzellen auf  $197,76 \pm 31,1$  pg/ $\mu$ g Protein\*30 min ( $p=1,26 \cdot 10^{-7}$  vs. Glc16,7 mM) ermitteln, was einer Steigerung von 85 % entspricht. Eny2-supprimierte Zellen zeigten unter diesen Bedingungen eine um 138 % gesteigerte Insulinsekretionsrate. In diesen Zellen stieg die Insulinsekretion auf einen Wert von  $467,55 \pm 116,06$  pg/ $\mu$ g Protein\*30 min ( $p=7,84 \cdot 10^{-6}$  vs. Glc16,7 mM;  $p=2,59 \cdot 10^{-6}$  Ko vs. Eny2-siRNA3; n=5).



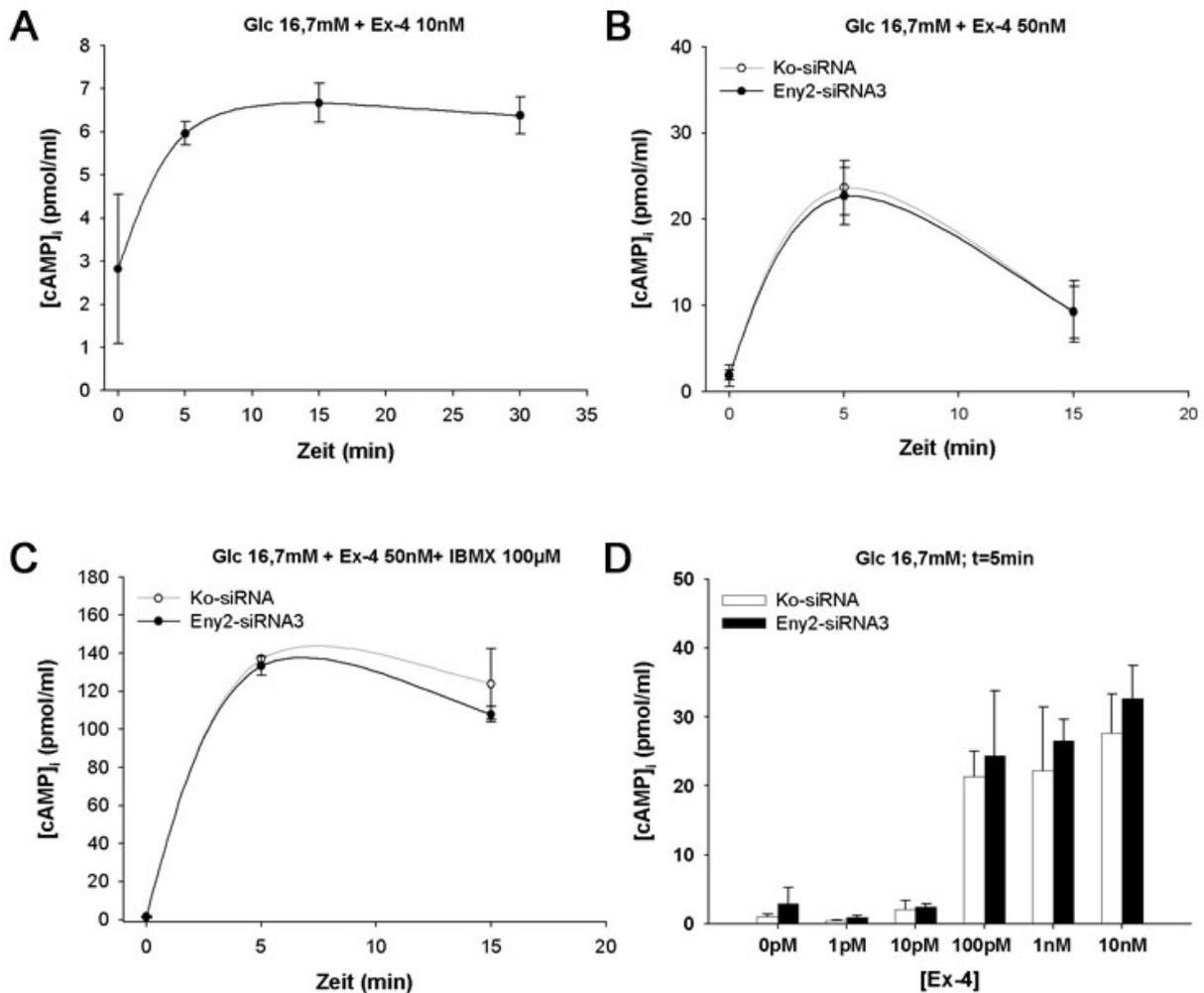
**Abb. 3.30: Sowohl der AC Aktivator Forskolin als auch der GLP-1-Rezeptor Agonist Ex-4 bewirken signifikant höhere Insulinsekretionswerte in INS-1E-Zellen mit Eny2-Suppression.**

Vorab mit entsprechender siRNA behandelte INS-1E-Zellen wurden gewaschen und anschließend die Insulinsekretion bei hoher (16,7 mM) Glukose, in An- oder Abwesenheit von Forskolin, bzw. Ex-4, bestimmt. Glc, Glukose; Fsk, Forskolin; Ex-4, Exendin-4. Die gezeigten Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von 5 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

### **Stimulation der cAMP Produktion**

Sowohl Forskolin als auch Exendin-4 führten in Eny2-supprimierten Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen zu signifikant höheren absoluten Insulinsekretionswerten. Die gemessene Sekretion von Insulin stellt jedoch bereits den letzten Schritt der daran beteiligten Signaltransduktionskette, ungeachtet der Signalkaskaden-Teilschritte, dar. Wie sich eine Eny2-Suppression auf die Adenylatzyklase und damit auf die Bildung des intrazellulären Botenstoffs cAMP auswirkt, wurde mittels cAMP-Assay nach Inkubation von sowohl kontrolltransfizierten als auch Eny2-supprimierten Zellen mit Ex-4 bei hoher Glukosekonzentration bestimmt. Das Ergebnis dieses Assays gibt die Abbildung 3.31 wieder. Zunächst wurde der optimale Zeitverlauf für den Assay bestimmt (Abb. 3.31 A). Dazu wurden unbehandelte INS-1E-Zellen unterschiedlich lang mit 16,7 mM Glukose und 10 nM Ex-4 inkubiert. Bis zu einer Zeit von 15 min konnte dabei ein Anstieg der cAMP-Konzentration verzeichnet werden. Nach diesem Zeitpunkt zeigten die ermittelten cAMP Werte kaum mehr eine Veränderung, so dass die nachfolgenden Experimente in einer Zeitspanne von 0 bis 15 min durchgeführt wurden. Abbildung 3.31 B zeigt den Zeitverlauf der cAMP-Produktion in Kontrollzellen und Zellen mit vermindertem Eny2-Niveau während der Behandlung mit 16,7 mM Glukose und 50 nM Ex-4. In beiden Zellen kommt es unter dem Einfluss von Ex-4 innerhalb von 5 min zu einem nahezu kongruenten Anstieg der cAMP-Konzentration von  $1,82 \pm 1,08$  auf  $23,65 \pm 2,71$  pmol/ml für Kontrollzellen und von  $1,9 \pm 0,48$  auf  $22,68 \pm 2,85$  pmol/ml für Zellen mit Eny2-Suppression. Innerhalb der folgenden 10 min kam es in beiden

Zellpopulationen zu einem ebenfalls fast identischen Abfall des cAMP-Gehalts auf  $9,19 \pm 6,64$  pmol/ml für Kontrollzellen und  $9,28 \pm 3,1$  pmol/ml für Eny2-supprimierte Zellen.



**Abb. 3.31: Eine Eny2-Suppression hat keinen Einfluss auf den cAMP-Anstieg nach Ex-4-Stimulus.**

A) Vorversuch mit untransfizierten INS-1E-Zellen bei 16,7 mM Glukose und zunächst 10 nM Ex-4, um einen ersten Eindruck über den Zeitrahmen des zu erwartenden cAMP-Anstiegs nach Ex-4-Stimulus zu erhalten. B)-D) Nach 72-stündiger Transfektion mit Kontroll- bzw. Eny2-siRNA3 wurde das intrazelluläre cAMP gemessen. B) Nach Stimulation der Zellen mit 16,7 mM Glukose und 50 nM Ex-4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. C) Nach Stimulation der Zellen mit 16,7 mM Glukose und 50 nM Ex-4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Anwesenheit des PDE Inhibitors IBMX. D) Nach Stimulation der Zellen mit 16,7 mM Glukose und unterschiedlichen Ex-4 Konzentrationen zum Zeitpunkt t=5 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.D. von 4-5 unabhängigen Experimenten.

Die cAMP-Konzentration in den Zellen wird durch die Balance zwischen den konkurrierenden Prozessen der Synthese und des Abbaus bestimmt (Cooper, 2003). Ob möglicherweise die Zeitpunkte, welche zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration gewählt wurden, höhere cAMP Werte nicht wiedergeben, da ein Teil des cAMPs infolge von Rückkopplungsmechanismen bereits der Hydrolyse durch die Phosphodiesterase (PDE)

unterzogen wurde (Capito et al., 1986), sollte durch Verwendung von Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) abgeklärt werden. Doch auch unter Verwendung des PDE-Inhibitors konnte kein nennenswerter Unterschied im Verlauf der cAMP-Produktion nach Ex-4-Gabe, bei hoher Glukosekonzentration, zwischen Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen, festgestellt werden (Abb. 3.31 C). Unter dem Einfluss von Ex-4 zusammen mit IBMX kam es zwar insgesamt, wie erwartet, zu einer deutlichen Zunahme der cAMP-Konzentration über das Niveau des cAMP-Assays, welcher ohne IBMX durchgeführt wurde, jedoch war diese für beide Zellpopulationen konvergent (Kontrollzellen: von  $1,29 \pm 0,37$  auf  $137,03 \pm 0,2$  pmol/ml; Eny2-supprimierte Zellen: von  $1,75 \pm 0,09$  auf  $133,48 \pm 3,55$  pmol/ml;  $t=5$  min).

Mit einem weiteren cAMP-Assay wurde der Wirkung unterschiedlicher Ex-4-Konzentrationen auf die cAMP-Produktion in Kontroll- und Eny2-supprimierten Zellen nachgegangen. Aber auch Ex-4-Konzentrationen von 1 pM bis 10 nM ergaben keinen wesentlichen Unterschied in den cAMP-Gehalten zwischen Kontrollzellen und Zellen mit siRNA-vermittelter Suppression von Eny2 (Abb. 3.31 D). Beide Zellpopulationen reagierten erst ab einer Ex-4-Konzentration von 0,1 nM mit einem deutlichen Anstieg der Konzentration des zyklischen Nukleotids (Kontrollzellen: von  $2,04 \pm 1,35$  pmol/ml bei Ex-4 10 pM auf  $21,34 \pm 3,27$  pmol/ml; Zellen mit Eny2-Suppression: von  $2,43 \pm 0,45$  pmol/ml bei Ex-4 10 pM auf  $24,34 \pm 9,49$  pmol/ml;  $t=5$  min) und wiesen auch bei einer 10 nanomolaren Ex-4-Konzentration keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer intrazellulären cAMP-Konzentration auf.

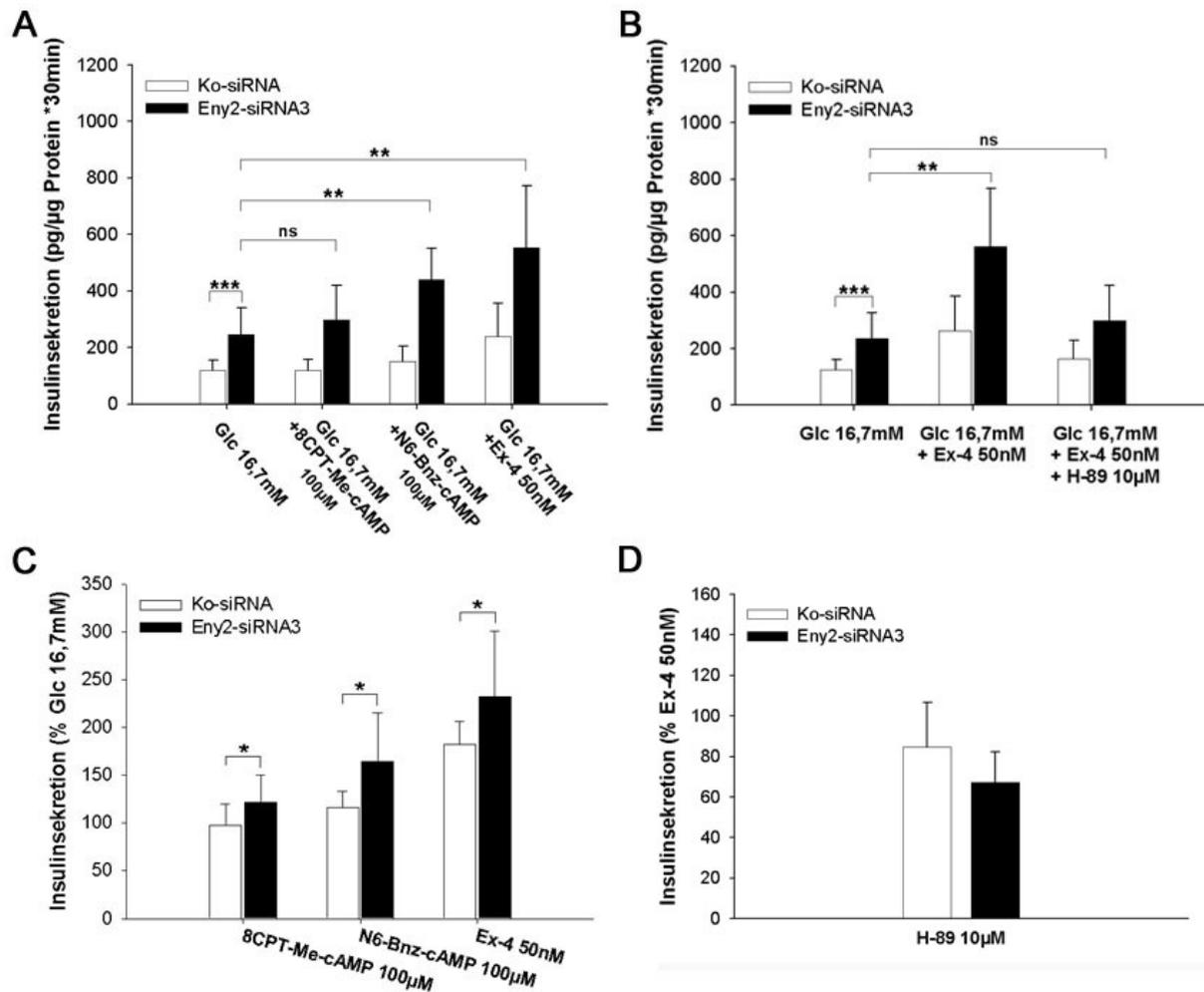
### **Aktivierung von Epac und PKA**

Aus der Literatur ist bekannt, dass der intrazelluläre Botenstoff cAMP in den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas zwei weitere Signalwege induziert. Zum einen vermittelt cAMP seine Wirkung über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Eliasson et al., 2003) zum anderen wird durch cAMP der so genannte Epac-Weg (*exchange proteins directly activated by cAMP*; de Rooij et al., 1998) aktiviert (Kashima et al., 2001).

Ob diese Signalwege in die durch Eny2-Suppression erhöhte inkretinvermittelte Insulinsekretion involviert sind, sollte im Folgenden überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Insulinsekretionsmessungen, unter Verwendung von Aktivatoren bzw. Inhibitoren der beiden Signalwege, an INS-1E-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit entsprechenden siRNA's behandelt wurden. Mit 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyl-3',5-cAMP (8CPT-Me-cAMP) und N6-Benzoyl-3',5-cAMP (N6-Bnz-cAMP) standen zwei potentielle Aktivatoren zur Verfügung, von denen bekannt ist, dass sie glukoseabhängig die Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen steigern. Während 8CPT-Me-cAMP selektiv den Epac-Weg aktiviert (Enserink et al., 2002), gilt N6-Bnz-cAMP als selektiver Aktivator des PKA-Weges (Christensen et al., 2003). Zur Inhibierung des PKA-Weges stand uns zudem noch H-89 zur Verfügung, für den Epac-Weg hingegen ist bis jetzt noch kein selektiver Hemmstoff beschrieben.

Wie in Abbildung 3.32 gezeigt, führte die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  8CPT-cAMP in Eny2-supprimierten Zellen, bei einer Glukosekonzentration von 16,7 mM, zu einem 22 %-igen jedoch nicht signifikanten Anstieg der Insulinsekretionswerte gegenüber dem Wert, der für 16,7 mM Glukose allein ermittelt wurde (Glc16,7mM:  $246,03 \pm 94,7$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min vs. 8CPT-Me-cAMP:  $297,72 \pm 121,42$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min). Auf Kontrollzellen hingegen, scheint der putative Epac-Aktivator keine Wirkung zu haben. Hier konnte keine steigende Veränderung der Insulinsekretion festgestellt werden (Glc 16,7 mM:  $118,93 \pm 36,49$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min vs. 8CPT-Me-cAMP:  $108,98 \pm 20,88$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min;  $p=8,33 \cdot 10^{-5}$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA3;  $n=6$ ). Dagegen bewirkte die Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  N6-Bnz-cAMP in Kontrollzellen einen leichten, allerdings nicht signifikanten Anstieg der Insulinsekretionswerte um 16 % auf  $150,27 \pm 50,02$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min. Wesentlich ausgeprägter war jedoch die Wirkung des PKA-Aktivators auf Eny2-supprimierte Zellen. Unter seinem Einfluss erhöhte sich die Sekretion von Insulin signifikant um 64 % auf  $439,73 \pm 110,68$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min ( $p=0,0089$  vs. Glc16,7 mM;  $p=2,25 \cdot 10^{-5}$  Ko-siRNA vs. Eny2-siRNA;  $n=4$ ).

Eine Inhibierung der PKA durch 10  $\mu\text{M}$  H-89, bei gleichzeitiger Stimulation der GLP-1-Rezeptorkaskade durch 50 nM Ex-4, führte in beiden Zellpopulationen zu einem Abfall der inkretinvermittelten Insulinsekretion, der jedoch nur für Zellen mit Eny2-Suppression signifikant war ( $p=0,01$ ). Für Kontrollzellen fiel der Sekretionswert von  $239,22 \pm 117,64$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min bei Ex-4-Inkubation auf  $164,48 \pm 64,99$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min unter der Inkubation mit H-89 ( $p=0,13$ ). In Zellen mit Eny2-Suppression kam es infolge der H-89-Wirkung zu einem Rückgang der Insulinsekretion von  $553,02 \pm 218,75$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min ohne PKA-Inhibitor auf  $299,48 \pm 125,26$  pg/ $\mu\text{g}$  Protein \*30 min ( $n=4$ ). Damit ist zwar der gemessene Insulinsekretionswert für Zellen mit Eny2-Suppression, gegenüber dem Wert der für Kontrollzellen ermittelt wurde, signifikant erhöht ( $p=0,02$ ), aber wie die prozentuale Berechnung wiedergibt (Abb. 3.32 C), kommt es in diesen Zellen unter dem Einfluss des PKA-Inhibitors zu einer weitaus stärkeren Verminderung der inkretinvermittelten Insulinsekretion (Kontrollzellen: -15 % vs. Zellen mit Eny2-Suppression: -33 %).



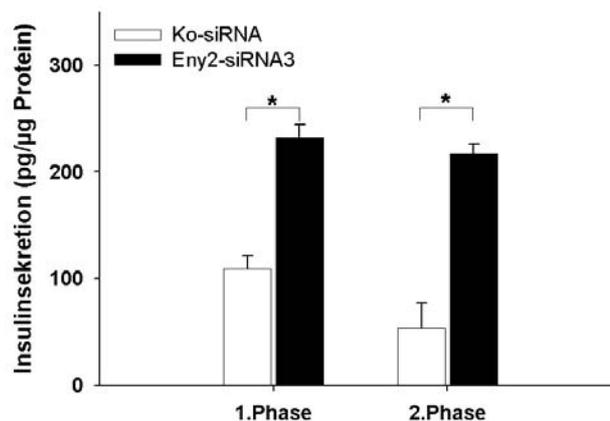
**Abb. 3.32: Einfluss der Eny2-Suppression nach Aktivierung, bzw. Inhibierung des Epac- und PKA-Signalweges auf die Insulinsekretion von INS-1E-Zellen.**

INS-1E-Zellen wurden mit Ko-siRNA bzw. Eny2-siRNA3 transfiziert. Nach 72-96 h wurden die Zellen gewaschen und Insulinsekretionsmessungen durchgeführt, bei entweder hoher Glukosekonzentration mit und ohne Epac-Aktivator 8CPT-Me-cAMP, bzw. mit und ohne PKA-Aktivator N6-Bnz-cAMP ODER bei hoher Glukosekonzentration in Anwesenheit von Ex-4 mit und ohne des PKA-Inhibitors H-89. Im Vergleich mit den Kontrollzellen zeigten Zellen mit Eny2-Suppression bei Aktivierung des Epac- bzw. PKA-Signalweges signifikant höhere Insulinsekretionswerte. Unter dem Einfluss des PKA-Inhibitors kam es zu einem größeren Abfall der inkretinvermittelten Insulinsekretion. A) und B) Absolute Insulinsekretionswerte gemessen in pg/μg Protein \* 30 min. C) Prozentuale Zunahme der Insulinsekretion nach Epac-, bzw. PKA-Aktivierung, bzw. nach Ex-4-Stimulus, gegenüber der Insulinsekretion bei hoher (16,7 mM) Glukosekonzentration. D) prozentualer Abfall der Inkretinvermittelten Insulinsekretion nach Inhibierung des PKA-Signalweges mit H-89. Glc, Glukose; Ex-4, Exendin-4; ns, nicht signifikant. Die gezeigten Werte repräsentieren den Mittelwert ± SD von 4-6 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. Die in (A) und (B) gezeigten Signifikanzen wurden über die einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test bestimmt. Für die Signifikanzen in (C) erfolgte der Datenvergleich mittels ungepaarten t-Test.

### 3.2.3.13 Wirkung der siRNA-vermittelten Suppression von Eny2 auf die 1. und 2. Phase der Insulinsekretion

Aus der Literatur ist bekannt, dass Insulin nach Glukosestimulus in 2 Phasen sezerniert wird, wobei jede der beiden Phasen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Henquin et al., 2002; Rorsman et al., 2000). Ob Eny2 möglicherweise in die beiden Phasen der Insulinsekretion involviert ist und dabei eventuell unterschiedliche Rollen spielt, sollte mit Insulinsekretionsmessungen an Zellen mit verminderter Eny2-Expression im Vergleich mit entsprechenden Kontrollzellen untersucht werden. Entsprechend transfizierte INS-1E-Zellen wurden zu diesem Zweck mit 16,7 mM Glukose plus 50 nM Ex-4 inkubiert. Nach 15 min wurde der Überstand abgenommen und durch frischen KRBH-Puffer mit den gleichen Stimulantien (16,7 mM Glukose und 50 nM Ex-4) ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 15 min inkubiert und abermals der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das sezernierte Insulin in den gewonnenen Überständen mittels ELISA gemessen.

In kontrolltransfizierten Zellen konnte in der 2.Phase der Insulinsekretion gegenüber der 1.Phase ein geringerer Insulinsekretionswert verzeichnet werden (1.Phase:  $109,5 \pm 11,52$  pg/ $\mu$ g Protein; 2.Phase:  $53,85 \pm 23,05$  pg/ $\mu$ g Protein). Hingegen waren die für Eny2-supprimierte Zellen gemessenen Insulinsekretionswerte in beiden Phasen nahezu gleich (1.Phase:  $231,98 \pm 12,17$  pg/ $\mu$ g Protein; 2. Phase:  $217,63 \pm 8,12$  pg/ $\mu$ g Protein) und gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ( $p=0,02$  für 1. und 2.Phase;  $n=3$ ), wodurch eine noch stärkere Beeinflussung der 2. Phase der Insulinsekretion durch einen Eny2-Knockdown indiziert wird.



**Abb. 3.33: Infolge der Suppression von Eny2 kommt es in INS-1E-Zellen sowohl zu einer Steigerung der 1. als auch der 2.Phase Insulinsekretion induziert durch Ex-4.**

Kontroll- und Eny2-siRNA3 transfizierte Zellen wurden mit 16,7 mM Glukose in Kombination mit 50 nM Ex-4 stimuliert. Nach einer Inkubation von 15 min wurde der Überstand zur Bestimmung der 1. Phase der Insulinsekretion abgenommen. Den Zellen wurden erneut 16,7 mM Glukose und Ex-4 zugegeben und nach weiteren 15 min das sezernierte Insulin im Überstand mittels ELISA bestimmt. Nach Eny2-Suppression ist sowohl eine gesteigerte 1. als auch 2. Phase der Insulinsekretion zu verzeichnen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD von 3 unabhängigen Versuchen. \* $p>0,05$ .

## 4 Diskussion

Der Typ 2 Diabetes mellitus stellt heute eine der weltweit am häufigsten auftretenden chronischen Krankheiten dar. Diabetische Folgeerkrankungen schränken Lebensqualität und Lebensspanne der betroffenen Individuen deutlich ein.

Da zunehmend Störungen des endokrinen Pankreas als eine zentrale Ursache für die Manifestation dieser Erkrankung angesehen werden, kommt der Erforschung jener Mechanismen, die physiologisch die Entwicklungs- und Funktionsabläufe dieses Organs steuern, eine besondere Rolle zu. Gegenstand dieser Dissertation war es daher, den Wissenstand über neue molekulare Regulatoren, die für die Differenzierung und den Funktionserhalt des endokrinen Pankreas von Bedeutung sind, zu erweitern.

### 4.1 Pax6 als molekularer Regulator der Differenzierung des endokrinen Pankreas

Sowohl die Entwicklung als auch die Ausdifferenzierung des endokrinen Pankreas erfordert, wie die anderer Organe und Gewebe auch, ein koordiniertes gewebs- und zellspezifisches Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren. Nicht selten haben homozygot vererbte Veränderungen der dabei involvierten Transkriptionsfaktoren schwere Entwicklungsstörungen oder den Tod des betroffenen Individuums zur Konsequenz. Heterozygot vererbte Defekte dieser Art zeigen einen milderen Phänotyp. Beispielhaft für solche Erkrankungen des endokrinen Pankreas ist der *maturity-onset diabetes of the young* (MODY; Malecki et al., 1999; O'Rahilly, 2009). Verschiedene Subtypen des autosomal dominant vererbten MODY-Diabetes werden durch Mutationen zentraler Transkriptionsfaktoren ausgelöst. Bekannte Beispiele dafür sind die MODY-Typen 1, 3 und 4, die mit Mutationen der Transkriptionsfaktoren HNF-4 $\alpha$  (*Hepatocyte Nuclear Factor*), HNF-1 $\alpha$  (Yamagata et al., 1996; Yamagata et al., 1996) und PDX1 (Stoffers et al., 1997) assoziiert sind.

Transkriptionsfaktoren bestehen in der Regel aus mindestens zwei Protein-Domänen, von denen eine der DNA-Bindung und die andere der Genaktivierung dient (Langdon et al., 2001). Daneben gibt es jedoch auch Transkriptionsfaktoren, die mehr als nur eine Domäne zur DNA-Bindung besitzen. Ein solcher Transkriptionsfaktor ist Pax6. Neben einer Transaktivierungsdomäne (TA) besitzt dieser zwei weitere Domänen, die Paired-Domäne (PD) und die Homöodomäne (HD), beide mit DNA-Bindungsfunktion (Treisman et al., 1991; Walther and Gruss, 1991).

Von Pax6 ist bekannt, dass er maßgeblich an der regulierten Differenzierung des endokrinen Pankreas beteiligt ist. Kommt es zur Inaktivierung des Pax6-Gens (Pax6<sup>-/-</sup>), verursacht dies

einen kompletten  $\alpha$ -Zell-Verlust, eine merkliche Reduktion der anderen klassischen Inselzelltypen sowie eine Desorganisation der Langerhansinsel-Struktur (St-Onge et al., 1997). Aber auch Mutationen dieses Transkriptionsfaktors in heterozygoter Ausprägung führen zu endokrinen Pankreasstörungen, wie die häufige Diabetesassoziation bei solchen Defekten zeigt (Ashery-Padan et al., 2004; Yasuda et al., 2002).

Pax6 ist darüber hinaus für die Entwicklung weiterer Organe, wie dem Auge dem Gehirn oder der Nase beteiligt. Dabei spielen die verschiedenen Domänen von Pax6 differenzielle Rollen. Während Mutationen der PD (Pax6<sup>Aey18</sup>) und auch der HD (Pax6<sup>4Neu</sup>) die Augenentwicklung gleichermaßen stark beeinflussen, kommt es im Zentralnervensystem nur durch Pax6-PD-Mutationen zu ausgeprägten Veränderungen, während HD-Mutationen Störungen im geringeren Umfang nach sich ziehen (Favor et al., 2001; Graw et al., 2005; Haubst et al., 2004).

Welche Bedeutung jedoch den verschiedenen Haupt-Domänen von Pax6 bei der Entwicklung des pankreatischen Inselorgans zukommt, war bislang unklar. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in dieser Arbeit erstmals die pankreatischen Phänotypen vier verschiedener Mauslinien, welche jeweils eine Mutation in einer der aufgeführten Pax6-Domänen aufwiesen, untersucht und miteinander verglichen.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der PD von Pax6 gegenüber der HD und der TA, die wesentlichste Rolle bei der Ausbildung des endokrinen Pankreas zukommt. Sie ist für die Entstehung ausdifferenzierter glukagonproduzierender  $\alpha$ -Zellen bei gleichzeitiger Suppression ghrelinproduzierender  $\epsilon$ -Zellen unabdingbar. Jedoch bewirken auch die Mutationen der HD sowie der TA einen eindeutigen Pankreasphänotyp. Inaktivierungen dieser Domänen führen zu einer Reduktion der finalen Zellzahl von vor allem glukagonproduzierenden  $\alpha$ - und auch insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen. Im Gegensatz zur PD scheinen diese beiden Pax6-Domänen bei der Ausdifferenzierung des endokrinen Pankreas eher eine modifizierende als spezifizierende Rolle einzunehmen.

#### **4.1.1 Die Transaktivierungsdomäne von Pax6 ist bedeutend für die finale Zahl pankreatischer $\alpha$ - und $\beta$ -Zellen, jedoch nicht für den finalen $\alpha$ -Zellphänotyp**

Die durch die Arbeiten von Sander et al. (1997) sowie Heller et al. (2004) bekannten Auswirkungen der Pax6<sup>Sey</sup>, bzw. der Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mutation auf den Phänotyp des endokrinen Pankreas konnte in der vorliegenden Arbeit weitgehend bestätigt werden. Beide Mutationen weisen defekte Spleißstellen des Pax6-Gens auf, die zum Verlust der TA und HD (Pax6<sup>Sey</sup>), bzw. nur der TA (Pax6<sup>Sey-Neu</sup>) im Pax6-Protein führen, während die PD funktionstüchtig bleibt. Diese Mutationen bewirken eine starke Reduktion der vier klassischen Inselzelltypen. Wir konnten an Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mausmutanten eine signifikante Reduktion der

glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen auf 25% des Wildtyp-Niveaus und einen ebenfalls deutlich, um 60%, reduzierten  $\beta$ -Zellanteil feststellen. Entgegen der Studie von Sander et al. (1997) erbrachten unsere Beobachtungen allerdings keinen Hinweis, dass diese Mutation die Anzahl somatostatinproduzierender  $\delta$ -Zellen oder die PP-produzierender  $\gamma$ -Zellen beeinflusst (Abb. 3.2 F, I). Da jedoch sowohl PP- als auch somatostatinpositive Zellareale nicht genauer quantitativ erfasst wurden, sind diese Aussagen nicht endgültig und bedürfen der Klärung. Zudem ergaben unsere Analysen der Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mutante ebenfalls eine abnormale Inselstruktur in Hinblick auf entsprechende Wildtyp-Kontrollen. Etwa um den 18,5-ten Tag der 21 Tage dauernden murinen Schwangerschaft beginnen sich, bei einem sich normal entwickelnden Mausembryo, die hormonproduzierenden Pankreaszellen clusterartig zu organisieren (Slack, 1995), um schließlich reife Langerhansinseln mit der typischen Architektur zu bilden. Die Inselzellen der Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mutanten liegen hingegen zum Teil einzeln, zum Teil in kleineren Komplexen zerstreut in den exokrinen Pankreasanteilen vor. Dabei ist jedoch unklar, ob Pax6 eine Rolle in der regulierten Expression von Insel-spezifischen Zell-Adhäsionsmolekülen, wie N-Cadherin oder NCAM (*Neuronal Cell Adhesions Molecule*) spielt (Moller et al., 1992) oder ob sich die unregelmäßige Inselstruktur sekundär, als Konsequenz aus der reduzierten Zellzahl ergibt (Sander et al., 1997).

#### 4.1.2 Die Homöodomäne von Pax6 moduliert die finale Zahl pankreatischer $\alpha$ - und $\beta$ -Zellen

Im Zusammenhang mit der Frage, welche Bedeutung die Pax6-Homöodomäne bei der Differenzierung endokriner Pankreaszellen hat, fanden in der vorliegenden Arbeit zwei Mauslinien Verwendung, die jeweils eine Punktmutation in der HD des Pax6-Gens aufwiesen (Pax6<sup>4Neu</sup>, Pax6<sup>14Neu</sup>). In beiden Fällen führt diese Mutation zu einem Aminosäure-Austausch in der  $\alpha$ -Helix 3 (Favor et al., 2008; Favor et al., 2001). Diese Helix dient der HD als DNA-Erkennungshelix und geht über ein Helix-Turn-Helix-Motiv bei der Interaktion mit der DNA Kontakte mit der großen Furche der DNA ein (Kissinger et al., 1990; Otting et al., 1990; Wilson et al., 1995). Die Pax6-HD bindet dabei mit großer Affinität, wie bei anderen Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren der *paired*-Klasse auch, als Dimer an eine als P3-Stelle bezeichnete, palindromische DNA-Sequenz der Zielgene (Czerny and Busslinger, 1995; Wilson et al., 1993).

Obwohl direkt benachbarte Aminosäuren des Pax6-Proteins von dem Aminosäure-Austausch in den beiden Pax6-HD-Mutanten betroffen sind, die beide zu einer Beeinflussung der P3-DNA-Bindung führen, zeigt die Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutante phänotypisch ausgeprägtere morphologische Differenzen gegenüber dem Wildtyp an. Die Quantifizierungen entsprechender Zellareale ergaben im embryonalem Pankreas (E 18,5) eindeutig eine starke

Verminderung glukagon- und insulinproduzierender Zellanteile. Das Verhältnis dieser beiden Zelllinien zu einander bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Gleich der Pax6-TA-Mutante (Pax6<sup>Sey-Neu</sup>) konnte auch im Pankreasphänotyp der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutante eine gravierende Störung der Inselorganisation festgestellt werden.

Mäuse mit homozygoter Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation hingegen lassen allein morphologisch zunächst keine Differenzen zum Pankreasphänotyp der Wildtyp-Kontrolle erkennen. Sie weisen eindeutig ausdifferenzierte Inselzellen mit gleichen  $\alpha$ -Zellanteilen wie der Wildtyp auf und präsentieren ebenfalls Langerhansinseln mit unauffälliger Architektur und Größe (Abb. 3.4). Bei der Quantifizierung ergab sich jedoch auch für diese Mutation eine reduzierte  $\beta$ -Zellmasse. In Übereinstimmung mit den gegensätzlichen Pankreasphänotypen die unsere Untersuchungen der beiden Pax6-HD-Mutanten ergaben, konnte an ihnen auch eine differenzielle Glukagon-Promotor Aktivierung festgestellt werden (Favor et al., 2008). Während die Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutation *in vitro* mit einer deutlich reduzierten Gen-Aktivierung einhergeht, zeigt die Pax6<sup>14Neu</sup>- Mutation sogar eine leicht gesteigerte Glukagon-Promotor Aktivität. Pax6 bindet neben dem Promoter des Glukagon-Gens (Andersen et al., 1999; Hussain and Habener, 1999) auch an die Promotoren des Insulin- (Sander et al., 1997) und des Somatostatin-Gens (Andersen et al., 1999). Zusammen mit einer zellspezifischen Kombination anderer Transkriptionsfaktoren führt Pax6 in normaler Ausprägung in den entsprechenden Zellen so zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivierung dieser Hormone. Es ist daher vorstellbar, dass eine unterschiedliche Beeinflussung des Insulin-Promotors durch die beiden Pax6-HD-Mutationen, auch den schon morphologisch erkennbaren verminderten Anteil insulinpositiver  $\beta$ -Zellen in der Pax6<sup>4Neu</sup>-Mutante begründet, während sich eine Verminderung der  $\beta$ -Zellmasse bei der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation erst in genaueren Analysen widerspiegelt. Entsprechend könnten DNA-Bindungs- als auch Hormon-Promotor-Assays zur Untersuchung dieser Hypothese herangezogen werden. Zusammenfassend lässt sich aus unseren Ergebnissen ableiten, dass die HD-Bindung von Pax6 an die P3-Sequenz der Zielgene für die vollständige Differenzierung der pankreatischen Inselzellphänotypen vermutlich eher eine untergeordnete Rolle spielt, aber sich wichtig für die finale Zellzahl zeigt.

#### **4.1.3 Die Paired-Domäne von Pax6 ist im Gegensatz zur HD und TA essentiell für die Ausprägung endokriner Pankreas-Zellen**

Die Analyse der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutante, bei welcher eine Spleißstellen-Mutation zum Verlust des Exon 5a und Exon 6 und damit zur Verhinderung der DNA-Bindung über die PD von Pax6 führt, ergab einen Pankreasphänotyp mit einem nahezu vollständigen Fehlen glukagonproduzierender  $\alpha$ -Zellen. Auch die Ausbildung anderer Inselzellen wird von dieser

Mutation beeinflusst. So konnte insbesondere eine signifikante Reduzierung der insulinpositiven Zellfläche gezeigt werden. Darüber hinaus zeigen sich auch die PP-Zellen vermindert und es kommt gleichfalls zum Verlust der physiologischen Inselarchitektur. Der Pankreasphänotyp der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation ähnelt folglich dem, wie er von St-Onge et al. (1997) für Pax6-Knockout-Tiere (Pax6<sup>-/-</sup>) beschrieben wurde.

Es stellt sich die Frage, ob die Pax6<sup>Aey18</sup> Mutation möglicherweise eine Degradation und damit ein Fehlen des Pax6-Proteins bewirkt und die schwerwiegenden Defekte des endokrinen Pankreas bei dieser Mutation, ähnlich dem Pax6-Knockout (Pax6<sup>-/-</sup>), allein auf den Protein-Verlust und nicht auf eine Inhibierung der DNA-Bindung via PD zurückzuführen wären. Hinweise aus den Immunmarkierungen mit einem Antikörper der gegen die TA des Pax6-Proteins gerichtet war, belegen jedoch, dass der von uns beobachtete pankreatische Phänotyp der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten, entgegen dem Pax6-Knockout, nicht die Folge des Fehlens oder einer verminderten Expression des Pax6-Proteins ist. Zum einen konnte eindeutig an den Gewebsschnitten der embryonalen Pankreata von Pax6<sup>Aey18</sup>-Tieren das Pax6-Protein in Anteilen ähnlich den Wildtyp-Kontrollen detektiert werden und zum anderen zeigen auch *in vitro* Studien an INS-1E-Zellen, mit um Exon 6 deletiertem Pax6, die Expression des mutierten Transkriptionsfaktors an. Dennoch kann die Mutation zu Konformationsänderungen des Pax6-Proteins führen, welche auch die HD und die TA implizieren und so zur Beeinträchtigung ihrer spezifischen Funktion führen. Da ein Funktionsverlust der anderen zwei Hauptdomänen von Pax6 jedoch wesentlich mildere Pankreasphänotypen nach sich zieht, ist anzunehmen, dass die drastischen Veränderungen im endokrinen Pankreas der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten, vorwiegend auf die finale Differenzierung der  $\alpha$ -Zellen, im Wesentlichen auf eine Inaktivierung der PD zurückzuführen sind. Unsere Ergebnisse gemeinsam mit den Erkenntnissen der Pax6-Knockout-Studien weisen darauf hin, dass zumindest ein teilweise funktionstüchtiges Pax6-Protein für einen finalen  $\alpha$ -Zellphänotyp unentbehrlich ist. Der Befund, dass Sander et al. (1997) sowie Heller et al. (2004) zwar eindeutig die Präsenz ausdifferenzierter  $\alpha$ -Zellen belegen, sowohl bei der Pax6<sup>Sey-Neu</sup>- als auch bei der Pax6<sup>Sey</sup>-Mutante, hingegen jedoch kein Pax6-Protein mit einem Antikörper bzw. Antiserum gerichtet gegen die PD detektierten, scheint daher im Widerspruch zu unseren Ergebnissen zu stehen. Ein vorzeitiger Proteinabbau aufgrund der Instabilität des mutierten Pax6-Proteins kann jedoch als Begründung für diese Diskrepanz ausgeschlossen werden. Eine denkbare Erklärung ist eine ungenügende Sensitivität des verwendeten Antikörpers bzw. Antiserums, zumal es Sander et al. (1997) möglich war Pax6-Protein im Neuralrohr homozygoter Pax6<sup>Sey-Neu</sup>-Mutanten nachzuweisen.

Die transkriptionellen Eigenschaften des Pax6-Proteins werden bestimmt von den Protein-Protein-Interaktionen, die dieses Protein eingeht. So kann beispielsweise die

Wechselwirkung mit anderen Proteinen an der Promotorsequenz eines Genes zu dessen Transkriptions-Steigerung führen (Hussain and Habener, 1999). Dagegen haben, wie bereits für andere Pax-Proteine beschrieben, Interaktionen mit Repressoren eine Inhibierung der Transkription entsprechender Gene zur Folge (Eberhard et al., 2000; Magnaghi et al., 1998). Darüber hinaus kann eine Interaktion mit einem entsprechenden Partner dem Pax6-Protein ebenfalls die Bindung an suboptimale DNA-Sequenzen erleichtern (Kamachi et al., 2001) und so die Zahl putativer Bindungsstellen an dem Zielgen erhöhen.

Alle 3 Domänen von Pax6, die PD, die HD und die TA, sind zur Protein-Protein-Interaktion, beispielsweise mit Maf-Proteinen, fähig (Planque et al., 2001). Eine Rekrutierung anderer Interaktionspartner zur teilweisen Kompensierung der durch die HD- bzw. TA-Mutation hervorgerufenen Defekte könnte daher eine mögliche Erklärung dafür sein, warum diese beiden Mutationen, im Gegensatz zur PD-Mutation, einen weitaus milderen Pankreasphänotyp zeigen. Die Funktion der PD, als primäre DNA-bindende Domäne von Pax6 (Chalepakakis et al., 1992; Czerny and Busslinger, 1995; Czerny et al., 1993) scheint hingegen durch keinen anderen Interaktionspartner kompensierbar.

Zusätzlich zeigte sich in unseren Untersuchungen, hervorgerufen durch die Deletion des Exons 6, bei der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation eine drastisch reduzierte Kerngängigkeit des Pax6-Proteins, was ebenfalls zum Phänotyp dieser Mutation beitragen könnte. Obwohl Datenbankanalysen kein klassisches nukleäres Lokalisationssignal in der Sequenz des Exons 6 erkennen ließen, konnte diese *in vivo* festgestellte subzelluläre Lokalisationsveränderung auch mittels *in-vitro*-Versuche bestätigt werden. Die Überexpression des entsprechend deletierten Pax6-Proteins führte in INS-1E-Insulinomzellen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle zu einer signifikanten Anhäufung des *paired box*-Proteins im Zytoplasma der transfizierten Zellen. Vor allem bei der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutation konnten dennoch, nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*, neben Zellen mit eindeutig zytoplasmatisch lokalisiertem Pax6-Protein, auch Zellen detektiert werden, bei denen sich das Pax6-Protein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma befand, bzw. bei denen sich die Pax6-Lokalisation ausschließlich auf den Kern beschränkte. Ähnliche Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit den natürlich auftretenden Spleißvarianten des Wachtel-Homologs von Pax6, Pax-QNR, gefunden (Carriere et al., 1995; Dozier et al., 1993). Transfektions-Experimente mit entsprechend mutierten Varianten dieses Transkriptionsfaktors ergaben, dass mindestens zwei nicht-klassische nukleäre Lokalisationssequenzen im Pax6-Protein existieren. Übereinstimmend befindet sich eine weitere, als nukleäre Lokalisationssequenz postulierte Aminosäuresequenz, mit der Aminosäurefolge LKRKLQR, in der Homöodomäne des Maus-Pax6-Proteins. Die große Divergenz die sich jedoch in unseren Lokalisationsstudien zeigt, von komplett Kern-lokalisiertem über Kern- und Zytoplasma-lokalisiertem bis zu ausschließlich zytoplasmatisch

aufretendem Pax6, ist dadurch allerdings nicht zu erklären. Möglicherweise werden die Effekte des mutierten Pax6-Proteins zumindest *in vitro* in den INS-1E-Zellen von endogenem Pax6 maskiert, so dass zur Umgehung dieses Problems eine Wiederholung der Experimente in heterologen Zelllinien erfolgen sollte. Eine Erklärung für das gleiche *in vivo* beobachtete Phänomen an fluoreszenz-markierten Gewebsschnitten des Pankreas der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutante könnte die gleichzeitige Erfassung unterschiedlicher mikroskopischer Ebenen sein.

Grundsätzlich ließe sich jedoch aufgrund der geringeren Kerngängigkeit des Pax6-Proteins bei der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutante nur eine Reduzierung der  $\alpha$ -Zellzahl, nicht aber der komplette Verlust der glukagonproduzierenden Zellen ableiten, zumal bei einem Großteil der Inselzellen der Mutanten überdies eine nukleäre Pax6-Lokalisation vorliegt.

#### 4.1.4 Die PD von Pax6 ist essentiell für den finalen $\alpha$ -Zellphänotyp

In Hinblick auf die anderen Inselzellpopulationen zeigt Pax6 die größten Effekte auf die Differenzierung der  $\alpha$ -Zelllinie. Gleich dem Pax6-Knockout führt ein Funktionsdefizit der PD von Pax6 nachweislich zum Fehlen glukagonpositiver  $\alpha$ -Zellen. Die Ursache für diesen Pankreasphänotyp kann einerseits eine komplett inhibierte Differenzierung der  $\alpha$ -Zelllinie und zum anderen eine Inhibierung der spezifischen Hormonexpression infolge eines inaktiven Pax6-Proteins sein. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde zum einen die Auswirkung der PD-Mutation (Pax6<sup>Aey18</sup>) auf die mRNA-Expression verschiedener relativ  $\alpha$ -Zell-spezifischer Gene, wie dem Glukagongen, dem Prohormonkonvertase-2- (PC2), Brain-4- (Brn4), Arx-, Irx2- und Smad7-Gen im Pankreas der PD-Mutanten untersucht und zum anderen wurden mutationsbedingte Effekte auf die Differenzierung anderer Inselzelllinien analysiert.

Für die pankreasspezifische Transkription des Glukagongens ist Pax6 ein essentieller Transkriptionsfaktor. Über eine Konsensusstelle in der Paired-Domäne bindet das Pax6-Protein an ein als PISCES (*Pancreatic Islet Cell-specific Enhancer Sequence*) bezeichnetes Sequenzmotiv aus 12 Basenpaaren, welches sich im Promotor des Glukagongens in zwei Kontrollelementen wieder finden lässt, die als Glukagon-Element 1 (G1) bzw. als Glukagon-Element 3 (G3) bezeichnet werden (Hussain and Habener, 1999; Knepel et al., 1990; Philippe et al., 1995; Ritz-Laser et al., 1999; Sander et al., 1997). Daher war es auch erwartet, dass sich eine deutlich inhibierte Expression des Glukagongens im Pankreas der Pax6<sup>Aey18</sup>-Mutanten feststellen ließ. PISCES-Sequenzmotive befinden sich ebenfalls in den Kontrollelementen des Somatostatin- und des Insulin-Gens, über welche die PD von Pax6 an die Promotoren dieser Hormon-Gene bindet (Andersen et al., 1999; Knepel et al., 1990). Die konservierte PISCES-Sequenz kommt dort jedoch, entgegen dem Glukagon-Promotor, nur

einmal vor, was die geringere Beeinflussung der spezifisch diese Hormone exprimierenden Zelllinien durch die Mutation in der PD von Pax6 erklären könnte (Heller et al., 2004).

Unsere Expressionsstudien ergaben darüber hinaus, dass die Mutation in der PD von Pax6 ebenfalls eine starke Reduktion der Expression der, neben den  $\alpha$ -Zellen ebenfalls in den  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen des Pankreas exprimierten, Prohormonkonvertase 2 (Malide et al., 1995) zur Folge hat. Die Transkription dieses Enzyms wird von Pax6 indirekt über die Rekrutierung anderer Interaktionspartner initiiert (Katz et al., 2009), wobei, als Rückschluss auf unsere Ergebnisse, die PD von Pax6 eine maßgebliche Rolle einzunehmen scheint. Auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Brn4, welcher im Synergismus mit Pax6 die Glukagonexpression steigert (Hussain et al., 1997), auf *Irx2* sowie *Smad7* hat Pax6 offensichtlich keinen Einfluss. Hingegen zeigten die PD-Mutanten eine deutlich gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors *Arx* gegenüber den Wildtypkontrollen an. Die Analyse des Effektes der PD-Mutation (*Pax6<sup>Aey18</sup>*) auf die Differenzierung anderer Inselzellpopulationen ergab überdies eine vermehrte Expansion einer anderen Inselzellspezies. Es kam zu einem ca. 5-fachen Anstieg ghrelinpositiver, glukagonnegativer  $\epsilon$ -Zellen (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis ist konvergent zu den Analysen an *Pax6<sup>Sey</sup>*-Mäusen bzw. dem sekundär beobachteten Verlust der Pax6-Expression im Zuge einer *Nkx2.2*-Defizienz, was ebenfalls mit einer Zunahme der  $\epsilon$ -Zellen einhergeht (Heller et al., 2005; Heller et al., 2004; Prado et al., 2004). Kontrovers hingegen erscheint unser Ergebnis der Zunahme der  $\epsilon$ -Zellen bei simultanem Anstieg der *Arx*-Expression und gleichzeitigem Verlust glukagonproduzierender  $\alpha$ -Zellen, mit den Befunden von Heller et al. (2004). Demnach geht der Verlust ghrelinproduzierender Zellen bei funktionell inaktivem *Arx*, auf den Verlust ghrelinpositiver, glukagonpositiver  $\alpha$ -Zellen zurück und die Entwicklung der ghrelinpositiven, glukagonnegativen  $\epsilon$ -Zellen erfolgt *Arx*-unabhängig. Unsere Ergebnisse lassen vielmehr den Rückschluss einer eventuell wechselseitigen Beziehung zwischen Pax6 und *Arx* zu, ähnlich der für Pax4 und *Arx* beschriebenen gegenseitigen Reprimierung (Collombat et al., 2005; Collombat et al., 2003), und dass *Arx* bei einer Pax6-Inhibierung zu einer Transition vom  $\alpha$ -Zell- zum  $\epsilon$ -Zellphänotyp führt. Da dieser Aspekt in unseren Studien nicht näher analysiert wurde, ebenso wie der Aspekt, dass möglicherweise eine Transition vom  $\beta$ - zum  $\epsilon$ -Zellphänotyp erfolgt, da insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen bei den PD-Mutanten ebenfalls signifikant reduziert waren, ist diesbezüglich jedoch keine definitive Aussage möglich.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Inaktivierung von Pax6 weiterreichendere Folgen als lediglich den Verlust der Expression des  $\alpha$ -Zell-spezifischen Hormons zur Konsequenz hat. Pax6 agiert dabei jedoch erst relativ spät in der Entwicklung der  $\alpha$ -Zelllinie, ist aber für den finalen  $\alpha$ -Zellphänotyp unabdingbar. Diesbezüglich nimmt die PD von Pax6 gegenüber den anderen Pax6-Domänen eine Schlüsselrolle ein.

#### 4.1.5 Ein intaktes Pax6-Protein ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Inselfunktion

Transkriptionsfaktoren spielen nicht nur in der Organentwicklung, sondern auch in der Aufrechterhaltung der spezifischen Organfunktion eine wichtige Rolle. Für das endokrine Pankreas beispielsweise, konnte ein Zusammenhang zwischen defekten Transkriptionsfaktoren und gestörten molekularen Abläufen in den  $\beta$ -Zellen gezeigt werden (Gauthier et al., 2009; Smart et al., 2006).

Über die Rolle von Pax6 in den Inselzellen adulter Individuen ist bisher jedoch nur sehr wenig bekannt. Die Möglichkeiten entsprechende Untersuchungen durchzuführen werden stark limitiert, da die meisten homozygoten Mutationen, die eine Inaktivierung von Pax6 nach sich ziehen, zum frühen postnatalen Tod führen. Bei heterozygot vererbten Pax6-Mutationen wiederum wird die Störung des mutierten Allels teilweise durch das intakte Allel kompensiert (Hamasaki et al., 2007).

Die Mauslinie Pax6<sup>14Neu</sup> weist homozygot eine Mutation in der HD von Pax6 auf. Dennoch erreichen Individuen dieser Art das Erwachsenenalter und sind darüber hinaus noch fertil. Dieser Umstand eröffnete uns die Möglichkeit die Auswirkungen dieser Mutation auf den physiologischen Phänotyp, hauptsächlich auf den Glukosemetabolismus, näher zu prüfen. Die infolge der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutation *in vitro* gemessene erhöhte Glukagon-Promotor-Aktivierung (Favor et al., 2008), aber auch die von uns ermittelte Erniedrigung der  $\beta$ -Zellmasse, ließen dabei auf einen erhöhten Blutglukosespiegel bei Mäusen mit dieser Mutation schließen. Interessanterweise waren jedoch merklich reduzierte Nüchternblutglukosewerte auffällig, was vielmehr auf eine Erhöhung des Plasmainsulins hindeutet. Doch entgegen unseren Vermutungen konnten wir eindeutig erniedrigte Plasmainsulinspiegel nachweisen, was mit der verminderten  $\beta$ -Zellmasse und ebenfalls mit der ermittelten Glukosetoleranzstörung dieser Tiere korreliert. Inselgröße, -architektur und glukagonpositive Zellareale waren hingegen statistisch nicht von den Wildtypkontrollen zu unterscheiden und auch die somatostatinproduzierenden sowie die PP-Zellen waren gegenüber dem Wildtyp unauffällig. Allerdings wurden diese nicht quantitativ erfasst.

Welche Mechanismen letztendlich zu diesem offensichtlichen Funktionsdefizit des endokrinen Pankreas bei diesen Mutanten beitragen muss durch weiterreichende Tests geklärt werden. Vor allem der scheinbare Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion bei Pax6<sup>14Neu</sup>-Mäusen, welches ebenfalls als ein typisches Symptom der Typ 2 Diabetes mellitus-Erkrankung gilt (Gerich, 2003), deutet auf eine Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen hin. Die Bestimmung der exakten Hormongehalte im Pankreas der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutanten bei gleichzeitiger Messung der Insulinsekretion könnte dazu beitragen, eine eventuell bestehende Hormon-Sekretionsstörung aufzudecken. Aber auch die Bestimmung des Plasmaglukagons sowie die genaue Ermittlung der Zahl somatostatinproduzierender  $\delta$ -

Zellen, welche parakrin inhibitorisch auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen wirken, könnten zur Klärung des funktionellen Phänotyps dieser Mutanten behilflich sein.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen gibt es Hinweise aus der Literatur, die einen Bezug zwischen Mutationen des Pax6-Transkriptionsfaktors und einer bestehenden Glukoseintoleranz, bis hin zum manifesten Typ 2 Diabestes mellitus bei Aniridi-Patienten anzeigen (Yasuda et al., 2002). Darüber hinaus lassen die Studien von Ashery Padan et al. (2004) auf eine Beteiligung von Pax6 bei der glukoseinduzierten Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen schließen. Als Konsequenz einer Pax6-Defizienz kam es im Pankreas entsprechender Individuen zu einer starken Verminderung der Expression des Glukosetransporter 2 (Glut2), ein für die normale Glukosehomöostase und endokrine Pankreasfunktion essentieller Transporter (Guillam et al., 1997). Zusammen mit unseren Ergebnissen lässt sich daraus folgern, dass Pax6 in weitreichendere Mechanismen involviert ist, die über eine Regulation der Expression entsprechender Inselhormone hinausgehen.

#### 4.1.6. Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem Vergleich verschiedener Pax6-Mutanten trägt diese Arbeit zum Verständnis der Rolle der verschiedenen Pax6-Domänen bei der Entwicklung pankreatischer Inselzelltypen bei. Die Ergebnisse unserer Studien lassen darauf schließen, dass insbesondere die PD von Pax6 ausschlaggebend für die Entwicklung des glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellphänotyps, bei gleichzeitiger Repression des ghrelinproduzierenden  $\epsilon$ -Zellsubtyps ist. Die HD sowie die TA von Pax6 modifizieren die Funktion der PD und tragen ebenfalls entscheidend zur finalen Zellzahl, insbesondere glukagonpositiver  $\alpha$ - und insulinpositiver  $\beta$ -Zellen, aber auch zu einer geordneten Inselarchitektur bei (Abb. 4.1). Erste Untersuchungen zur Glukosehomöostase an einer Mauslinie mit homozygoter HD-Mutation indizieren darüber hinaus, dass Pax6 auch in den Funktionserhalt adulter Inseln involviert ist. Ob sich die Rolle von Pax6 dabei lediglich auf die spezifische Hormonexpression beschränkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt. An diesem Punkt sollten zukünftige Analysen ansetzen. So könnten Insulinsekretionen an isolierten Inseln der Pax6<sup>14Neu</sup>-Mutanten, bei gleichzeitiger Bestimmung der Hormongehalte, unser Wissen über Pax6 als Regulator endokriner Zellfunktionen entscheidend verbessern. Aber auch für die Erforschung der Beziehung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen bietet diese Mutante interessante Möglichkeiten. Um unser Verständnis über die Entwicklung der einzelnen Inselsubtypen zu vergrößern, sollten zudem weiterführende Untersuchungen zu spezifischen Zielgenen bzw. Interaktionspartnern der verschiedenen Pax6-Domänen durchgeführt werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse könnten wiederum für die Entwicklung neuer Diabetes-Therapien, wie beispielsweise der Differenzierung embryonaler Stammzellen, genutzt werden.

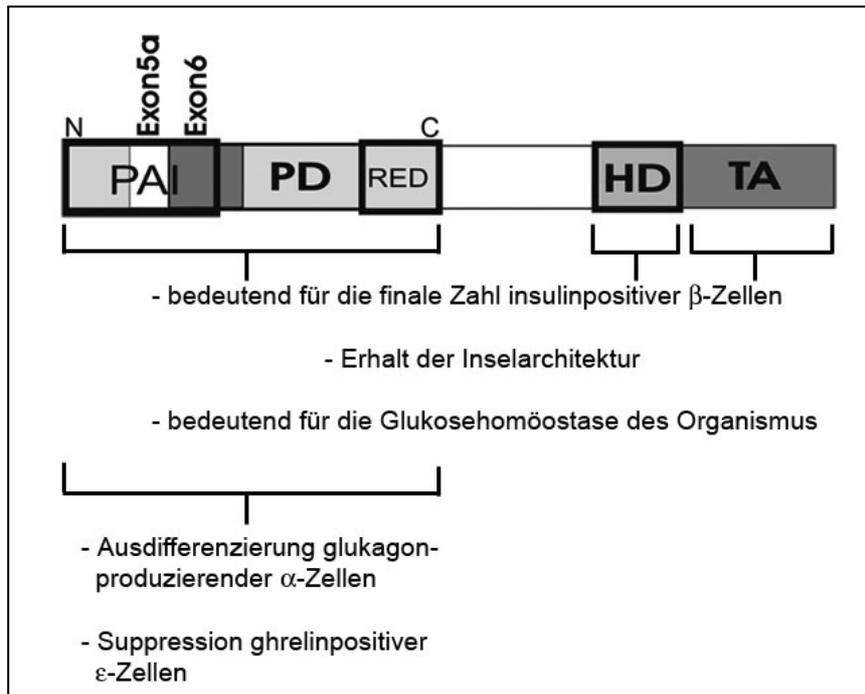


Abb. 4.1 Funktionen der verschiedenen Pax6-Hauptdomänen.

## 4.2 Molekulare Regulatoren für den Funktionserhalt des endokrinen Pankreas

In der Pathogenese des Diabetes mellitus spielt die insulinproduzierende  $\beta$ -Zelle, die das einzige blutzuckersenkende Hormon des Organismus bildet und sezerniert, eine entscheidende Rolle. Neben der primären Insulinresistenz ist es vor allem eine zunehmende Sekretionsinsuffizienz dieses pankreatischen Zelltyps, die zur Manifestation des Typ 2 Diabetes beiträgt. Um bessere Einblicke in die darin implizierten regulatorischen Mechanismen zu erlangen, von denen sich eventuell neue therapeutische Strategien ableiten lassen, dienten als Ansatzpunkt für den zweiten Teil dieser Arbeit die mRNA-Expressionsprofile endokriner Pankreata trächtiger und nicht trächtiger C57BL/6-Mäuse. Ähnlich der humanen Schwangerschaft spielen sich während der Schwangerschaft von Nagetieren im Pankreas Prozesse ab, die gegenläufig zu denen der Diabetes-Entstehung sind. Deshalb stellen die in diesem Modell differentiell exprimierte Gene interessante Kandidaten dar, um die Regulation von  $\beta$ -Zellproliferation, Glukosesensitivität, aber vor allem auch Insulinsekretion zu untersuchen. Aufgrund ihrer relativ stark gesteigerten, bzw. verminderten Expression wurden von der Vielzahl der über die Expressionsprofile identifizierten, unterschiedlich exprimierten Gene, Commd7, Rik, Tcf25 sowie Eny2

ausgewählt, um ihre mögliche regulatorische Funktion in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle näher zu analysieren.

Während der Literatur kaum Hinweise zu einer möglichen Funktion oder zum Vorkommen des Commd7-Proteins zu entnehmen sind, indizieren andere Mitglieder der Commd-Familie, dass diese Proteine, mit dem gemeinsamen carboxyterminalen Strukturmotiv der Comm-Domäne (*Copper metabolism gene MURR1*), eine Rolle in der zellulären Homöostase spielen. Sie sind beteiligt an der Regulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sowie der Zell-Proliferation, aber auch an der Kontrolle der Kupfer-Homöostase und der Funktion des epithelialen Natrium-Kanals (Burstein et al., 2005; Maine and Burstein, 2007; Maine and Burstein, 2007). Über das von der RIKEN cDNA 1110008P14 kodierte Protein Rik gab die Literatur ebenfalls keine Information wieder. Der Transkriptionsfaktor Tcf25 hingegen ist in verschiedene Prozesse der Organogenese während der Embryonalentwicklung involviert (Cai et al., 2006; Olsson et al., 2002; Taylor et al., 2006) und scheint überdies eine Rolle bei der Apoptosekontrolle einzunehmen (Steen and Lindholm, 2008). Eny2 (*Enhancer of yellow homolog2*) ist ein in der Evolution sehr hoch konserviertes Protein. Die Funktionen dieses Proteins sind jedoch vorwiegend aus Studien an Hefen, bzw. Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* bekannt. Dort ist Eny2, bzw. Sus1, das Eny2-Homolog der Hefe, an multiplen nukleären Prozessen beteiligt, welche die Genexpression, aber auch den Transport der mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma umfassen (Pascual-Garcia et al., 2008; Pascual-Garcia and Rodriguez-Navarro, 2009). Darüber hinaus werden Eny2 putative Rollen bei der nukleären mRNA-Reifung sowie der zytoplasmatischen mRNA-Degradation zu geschrieben (Cuenca-Bono et al., 2010; Kopytova et al., 2009).

#### **4.2.1 Funktionelle Analyse der Kandidatengene durch Modifikation des Expressionsniveaus**

Dass die gewählten Kandidatengene unter physiologischen Bedingungen in den Langerhansschen Inseln von C57BL/6-Mäusen beider Geschlechter exprimiert werden, konnte erstmalig von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Ebenfalls dokumentierten wir erstmals die spezifische Expression dieser Gene unter physiologischen Bedingungen in einer insulinproduzierenden Zelllinie (INS-1E; Ratten-Insulinomzellen). Die deutlich veränderten Expressionsniveaus der Kandidatengene am Tag E 12,5 der murinen Schwangerschaft weisen überdies auf eine putative Beteiligung dieser Gene an den schwangerschaftsbedingten Adaptationsmechanismen der  $\beta$ -Zellen hin. Daher wurde das Expressionsniveau der gewählten Gene in den als  $\beta$ -Zell-Modell geltenden INS-1E-Zellen moduliert, um in anschließenden Funktionsanalysen der Bedeutsamkeit der Gene

für die Proliferation/Apoptose und speziell auch für die glukoseinduzierte Insulinsekretion von  $\beta$ -Zellen nachzugehen. Über den methodischen Ansatz der homologen Überexpression konnte jedoch bei keinem der ausgesuchten Gene ein zuverlässiger phänotypischer Effekt belegt werden. Da methodische Probleme bei dieser Art der Modulation des Expressionsniveaus nicht auszuschließen waren, wurden ebenfalls siRNA-vermittelte Suppressionen der Kandidatengene in der INS-1E-Zelllinie durchgeführt. Über diese Modifikation der Expression wurde für eines der Kandidatengene, für Eny2, die Beteiligung an  $\beta$ -Zellfunktionen nachgewiesen, wie sie bisher noch nicht für dieses Protein dokumentiert wurden. Erste siRNA-Experimente zur Expressionsmodulation von Tcf25 (Ergebnisse nicht dargestellt) deuten überdies darauf hin, dass sich über diese Behandlungsweise auch für andere Kandidatengene regulatorische Effekte abzeichnen könnten.

Bei retrospektiver Betrachtung dieser Ergebnisse wird offensichtlich, dass die Wahl verhältnismäßig unbekannter Gene einen relativ gewagten Ansatz darstellt. Es war und ist zum Teil nicht abzuzeichnen, in welche Zellmechanismen die Kandidatenproteine involviert sein könnten, was wiederum die Auswahl geeigneter analytischer Experimente erschwert. Zudem zeigen unsere Ergebnisse, dass Überexpressionsstudien in der gewählten Tumorzelllinie technisch relativ schwer umzusetzen sind und ein primärer siRNA-Ansatz zur Kandidatengen-Analyse angebrachter erscheint. Bezüglich der Frage nach geeigneten Kandidatengenen hätten vergleichende Expressionsprofile mindestens eines weiteren Tiermodells herangezogen und die Auswahl anhand einer sich im Durchschnitt erhöht bzw. erniedrigt zeigenden Genexpression erfolgen sollen. Andererseits wurde jedoch auch durch die von uns durchgeführten Analysen ein für die Regulation der  $\beta$ -Zellfunktion neues Gen, Eny2, identifiziert.

#### **4.2.2 Die siRNA-vermittelte Suppression von Eny2 führt zu einer Verbesserung der glukoseinduzierten sowie inkretinvermittelten Insulinsekretion in INS-1E-Zellen**

Während den schwangerschaftsbedingten, adaptiven Vorgängen in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen kommt es zu einer erhöhten Expression von Eny2. Eine Suppression dieses multifunktionalen, überwiegend nukleären Proteins in INS-1E-Insulinomzellen, welches in die fundamentalen Prozesse der Transkription sowie des RNA-Metabolismus involviert ist (Cuenca-Bono et al., 2010; Ellisdon et al., 2009; Jani et al., 2009; Pascual-Garcia et al., 2008; Pascual-Garcia and Rodriguez-Navarro, 2009; Zhao et al., 2008), ließ daher massive Beeinträchtigungen der zellulären Funktionen vermuten. Doch interessanterweise verbesserte die siRNA vermittelte Verminderung des Expressionsniveaus von Eny2 deutlich die Insulinsekretionskapazität der INS-1E-Zellen. So konnte insbesondere eine deutlich gesteigerte glukosestimulierte, aber auch inkretinvermittelte Insulinsekretion nachgewiesen

werden, die mit einer deutlichen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  einhergeht. Dieses Ergebnis war überraschend und es stellt sich deshalb die Frage, ob die siRNA induzierten Effekte, spezifisch auf eine Suppression des endogenen Eny2 zurückzuführen sind. Die Verwendung von zwei genspezifischen siRNA-Molekülen, die grundsätzlich die gleichen phänotypischen Wirkungen in den verwendeten INS-1E-Zellen zeigen sowie der Nachweis, dass beide eine Verminderung der Expression des Eny2-Gens auf mRNA-Niveau bewirken, indizieren jedoch eine spezifische Beteiligung von Eny2 an diesen Zellfunktionen. Eine definitivere Klärung dieser Frage würde der Nachweis der siRNA-Effizienz auf Protein-Ebene erbringen. Dies gestaltet sich derzeit jedoch noch als schwierig, da keine kommerziell zu beziehenden Antikörper gegen das Eny2-Protein zur Verfügung stehen.

#### **4.2.2.1 Ein gesteigerter Glukosemetabolismus begründet nur teilweise die gesteigerte glukosestimulierte Insulinsekretion nach Eny2-Suppression**

Als ersten Schritt zur Klärung über welche Mechanismen eine Eny2-Suppression die gesteigerte glukoseinduzierte, bzw. inkretinvermittelte Insulinsekretion bewirkt, untersuchten wir sowohl die Proliferation (Vitalität) als auch den Insulingehalt Eny2-siRNA-transfizierter Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen. Auf diese Parameter sowie auf den Proteingehalt (Daten nicht gezeigt), war jedoch kein signifikanter Einfluss eines Eny2-Knockdowns feststellbar. Diese Befunde legen nahe, dass die gemessenen Differenzen in den Insulinsekretionen von Zellen mit unterschiedlichem Eny2-Niveau, auf Veränderungen in der Stimulus-Sekretionskopplung basieren.

Unter physiologischen Bedingungen ist die glukosestimulierte Insulinsekretion von pankreatischen  $\beta$ -Zellen das Ergebnis einer Kombination aus Triggering- und Amplifizierungs-Signalen (Triggering und Amplifying Pathway), welche aus dem Zell-Metabolismus hervorgehen. Einerseits wird durch die intrazelluläre Verstoffwechslung von Glukose ATP generiert, was zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses im Zytosol führt und das Auslöse- (Trigger-) Signal für die Exozytose von Insulin stellt (Ashcroft and Rorsman, 1989; Henquin, 2000). Andererseits werden durch den Metabolismus weitere Signale erzeugt, die zu einer Verstärkung dieser Insulinsekretion führen (Gembal et al., 1992; Wollheim and Maechler, 2002). Welche Faktoren dabei jedoch genau die metabolische Verstärkung der Insulinsekretion induzieren, wird kontrovers diskutiert (Wollheim and Maechler, 2002).

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass es infolge eines extrazellulären Glukoseanstiegs zu einer metabolisch bedingten, zytoplasmatischen Zunahme der NADPH-Konzentration kommt, und dass diese parallel zum Anstieg der glukosestimulierten

Insulinsekretion verläuft (Ivarsson et al., 2005; Ronnebaum et al., 2006). Über die intrazelluläre NADPH-Konzentration lassen sich von daher Rückschlüsse auf den Metabolismus der Zelle ziehen. Dementsprechend untersuchten wir, ob die erhöhte glukoseabhängige Insulinsekretion Eny2-supprimierter INS-1E-Zellen auf Veränderungen im Metabolismus dieser Zellen zurückzuführen sind. Unter Anwendung des MTT-Assays (Janjic and Wollheim, 1992) ließ sich diesbezüglich eine gegenüber Kontrollzellen signifikant erhöhte Steigerung der Metabolismusrate in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration feststellen. Ähnlich unseren Ergebnissen konnten Lu et al. ebenfalls eine Korrelation zwischen einer gesteigerten metabolischen Aktivität und einer verstärkten Insulinsekretion in INS-1 Zellen zeigen (Lu et al., 2002). Sie verglichen Subklone parentaler INS-1 Zellen mit unterschiedlichem Potential an glukosestimulierter Insulinsekretion und wiesen nach, dass metabolische Differenzen für die unterschiedliche sekretorische Antwort verantwortlich sind. Insbesondere konnten sie zeigen, dass ein erhöhter Fluss von Trikarbonsäurezyklus-Intermediaten über einen so genannten Pyruvat-Cycling Pathway mit einer verstärkten Akkumulation von Reduktionsäquivalenten korreliert und ebenfalls mit einer Zunahme der Insulinsekretion einhergeht. Aus ihren Studien geht jedoch nicht hervor, welches die molekularen Hintergründe für den unterschiedlich starken Pyruvat-Umsatz der verschiedenen Zellklone sind.

Da die metabolische Aktivität einer Zelle wesentlich von der Aufnahme der Glukose in die Zelle, als auch vom glykolytischen Umsatz dieser Hexose abhängt, analysierten wir die Expression verschiedener daran beteiligter Proteine auf mRNA-Ebene, um so eventuell Faktoren zu identifizieren, die den erhöhten Metabolismus in INS-1E-Zellen mit Eny2-Suppression erklären können. Doch weder die Expression des Glukosetransportproteins (Glut2) selbst, noch die Expression der Glykolyseenzyme, Glukokinase und Phosphofruktokinase, wurden durch einen Eny2-Knockdown beeinflusst. Zusätzlich wurden auch die Expression des Insulins und die des Transkriptionsfaktors PDX1 untersucht. Auch diese zeigten sich unverändert, was unsere Beobachtungen hinsichtlich des unveränderten Insulin-Gehalts in Zellen mit verschiedenem Eny2-Niveau stützt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass ein Eny2-Knockdown Faktoren beeinflusst, die distal der bereits untersuchten Komponenten eine erhöhte Metabolismusrate bedingen. Da der Glukosemetabolismus vor allem auch über den mitochondrialen Stoffwechsel einen Konzentrationsanstieg von Reduktionsäquivalenten bewirkt, wäre vor allem auch eine Wirkung einer Eny2-Suppression auf dieser Ebene denkbar.

Um potentielle Auswirkungen einer Eny2-Suppression auf den Triggering- und metabolischen Amplifying Pathway zu untersuchen, wurden Insulinsekretionsmessungen unter zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen durchgeführt. Zum einen wurde ein glukose-, bzw. ATP-unabhängiger Verschluss der ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle durch den

Sulfonylharnstoff Tolbutamid induziert (Schwanstecher et al., 1994) und zum anderen wurde die Öffnung dieser Kanäle durch Applikation von Diazoxid bewirkt, was in Kombination mit extrazellulär hoher  $K^+$ -Konzentration ebenfalls zu einer Depolarisation der Zelle, damit zum intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg und so zu einer gesteigerten Insulinsekretion führt (Gembal et al., 1992). Erhöht man unter diesen letztgenannten Bedingungen die Glukosekonzentration, lassen sich Rückschlüsse auf die Stoffwechsel-abhängige Amplifizierung der Insulinsekretion ableiten.

Unter beiden experimentellen Bedingungen, konnte so schon bei basaler (2,8 mM) Glukosekonzentration eine gegenüber Kontrollzellen deutlich erhöhte Insulinsekretion in Eny2-supprimierten Zellen erzielt werden. Ohne Zusätze bewirkte diese basale Glukosekonzentration, hinsichtlich der Insulinsekretion oder des Stoffwechsels, jedoch keine offenkundigen Differenzen zwischen Zellen mit unterschiedlichem Eny2-Niveau. Daher suggerieren diese Ergebnisse, dass ein Anstieg der sekretorischen Antwort nach Eny2-Knockdown, neben Prozessen die zu erhöhten Metabolismusraten führen, auch Prozesse stromaufwärts des Glukose-Stoffwechsels und des daraus hervorgehenden ATPs beeinflusst.

Eine Erhöhung der Glukosekonzentration in Kombination mit Diazoxid und depolarisierenden  $K^+$ -Konzentrationen bewirkte keinen weiteren Anstieg der Insulinsekretion, weder in Kontrollzellen, noch in Zellen mit Eny2-Suppression. Diese Befunde unterstützen einerseits die oben aufgeführte Annahme und andererseits zeigen sie, dass in den von uns verwendeten INS-1E-Zellen die Mechanismen der metabolischen Verstärkung nicht zur glukoseabhängigen Insulinsekretion beitragen. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung warum, entgegen den von Merglen et al. (2004) an INS-1E-Zellen durchgeführten Untersuchungen, in unseren Zellen, zumindest unter Kontrollbedingungen, eine glukoseinduzierte Insulinsekretion maximal bis zu einer Glukosekonzentration von 11,2 mM zu verzeichnen war (Abb. 3.14 und 3.18) und warum der Anstieg der Insulinsekretion bei Hochglukose maximal nur dem 2-fachen Basalwert entsprach. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass sich der Effekt der Eny2-Suppression auf die Insulinsekretion nicht aus einer metabolisch induzierten Amplifizierung der Insulinsekretion begründet und zum Teil auch auf ATP-unabhängige Prozesse zurückzuführen ist.

Allgemein gilt die Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses und der daraus resultierende Verschluss der  $K^+$ -Kanäle als Trigger-Signal für die Insulinsekretion. Da unsere Daten jedoch keine konkreten Rückschlüsse auf den Einfluss von Eny2 auf diesen ATP-abhängigen Mechanismus der Insulinsekretion zulassen, sollten zukünftig Messungen des ATP/ADP-Verhältnisses, aber auch Untersuchungen bezüglich der ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanäle mit einbezogen werden, um dieser Frage nachzugehen und auch um den genauen

Zusammenhang zwischen dem glukoseabhängig gesteigerten Stoffwechsel und der gesteigerten glukoseabhängigen Insulinsekretion in Eny2-supprimierten Zellen zu erörtern. Verschiedene Studien weisen auf eine Rolle von NADPH als putatives Signal-Molekül hin, durch welches die stoffwechselunterstützte Verstärkung der Insulinsekretion vermittelt wird (Jensen et al., 2008; MacDonald et al., 2005). Andere Studien widersprechen dieser Vorstellung, können jedoch die Frage nach einem entsprechenden Mechanismus oder Messenger nicht abschließend beantworten (Odegaard et al., 2010; Panten and Rustenbeck, 2008). Es ist deshalb vorstellbar, dass die von uns verwendeten INS-1E-Zellen, mit inaktivem Metabolic Amplifying Pathway, bei einem entsprechenden Vergleich mit voll funktionstüchtigen INS-1E-Zellen, zur Klärung dieser Frage beitragen könnten.

#### **4.2.2.2 Ein gesteigerter PKA-Signalweg erklärt zumindest zum Teil die gesteigerte inkretinvermittelte Insulinsekretion nach Eny2-Knockdown**

Für eine regulierte Insulinfreisetzung nach einem Nahrungsbolus ist neben der Glukose unter anderem auch das intestinal von den L-Zellen sezernierte GLP-1-Hormon von entscheidender Bedeutung (Fehmann and Habener, 1992; Orskov, 1992). Über die Bindung an den GLP-1-Rezeptor in der Membran pankreatischer  $\beta$ -Zellen stimuliert es die Aktivität einer Adenylatzyklase. Die dadurch bedingte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert wiederum zwei weitere Signalwege, den Epac- und den PKA-Signalweg (Yu and Jin, 2009), welche letztendlich die GLP-1-Effekte vermitteln. Synergistisch mit Glukose bewirkt das Inkretin-Hormon so eine Potenzierung der glukoseinduzierten Insulinsekretion.

Unter Anwendung des GLP-1 Analogons Exendin-4 (Ex-4; Goke et al., 1993; Thorens et al., 1993) konnten wir in INS-1E-Zellen nach Eny2-Suppression eine deutlicher gesteigerte Insulinfreisetzung messen, wobei vor allem die zweite Phase der Insulinsekretion deutlicher betroffen zu sein scheint als die erste. Weiterhin führt ein Eny2-Knockdown nach Aktivierung der GLP-1-Rezeptorkaskade zu signifikant höheren intrazellulären Kalziumkonzentrationen, welche den verstärkten Anstieg der Insulinsekretion gegenüber Kontrollzellen begründen. Insulinsekretionsmessungen unter kalziumfreien Bedingungen zeigten zudem, dass die Effekte einer Suppression von Eny2 essentiell an extrazelluläres Kalzium gebunden sind.

Da der Effekt eines Eny2-Kockdowns additiv zu dem hoher Glukosekonzentrationen ist und überdies ebenfalls durch Forskolin induzierbar, vermuteten wir eine Beeinflussung der GLP-1-Rezeptorkaskade durch Eny2. Die Bestimmung des intrazellulären cAMP nach Aktivierung der Adenylatzyklase konnte keine Differenzen zwischen Zellen mit unterschiedlichem Eny2-Niveau aufzeigen, was eine Wirkung des Eny2-Knockdowns auf cAMP-distale Prozesse signalisiert. Um dieser Hypothese nachzugehen, führten wir Insulinsekretionsmessungen

unter Anwendung verschiedener pharmakologischer Agenzien durch, welche in die unterschiedlichen Teilschritte der GLP-1-Signalkaskade eingreifen. Dabei konnten eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion durch den PKA-spezifischen Aktivator N6-Bnz-cAMP (Christensen et al., 2003), nicht aber durch äquivalente Mengen des spezifischen Epac-Aktivators 8CPT-Me-cAMP (Enserink et al., 2002) erzielt werden. Darüber hinaus bewirkte der PKA-Inhibitor H-89 eine deutliche Verminderung der durch Ex-4 induzierten sekretorischen Antwort, so dass die additive Wirkung der Eny2-Suppression auf die inkretinvermittelte Insulinsekretion vollständig aufgehoben wurde und wieder Sekretionswerte erreicht wurden, die denen hoher (16,7mM) Glukosekonzentrationen ohne weitere Zusätze entsprachen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der steigernde Effekt einer Eny2-Suppression auf die inkretinabhängige Insulinsekretion vor allem über den PKA-Signalweg vermittelt wird. Interessanterweise konnten Yang et al. (2004) bei einem Vergleich von INS-1 Subklonen, welche sich in ihrer sekretorischen Antwort sowohl gegenüber Glukose als auch Forskolin deutlich unterschieden, zeigen, dass sich diese Unterschiede ebenfalls vor allem aus Veränderungen des PKA-Signalweges ergeben. Ob sich jedoch, ähnlich wie in dieser Studie, die differentielle inkretinabhängige Insulinsekretion von INS-1E-Zellen mit unterschiedlichem Eny2-Gehalt, ebenfalls aus einer differentiellen Expression der PKA begründet, muss erst noch durch entsprechende Analysen überprüft werden. Dahingehend vorstellbar wäre eine Untersuchung des Expressionsstatus der PKA selbst, bzw. könnten über die Bestimmung der Aktivität der PKA Rückschlüsse darauf gezogen werden, indem man beispielsweise den Phosphorylierungsgrad bestimmter bekannter PKA-Zielmoleküle, wie CREB (*cAMP Response Element Bindingprotein*), ermittelt. Erste dementsprechende Experimente wurden auch schon durchgeführt (Lechner and Weise, unveröffentlichte Ergebnisse), konnten jedoch bisher keine konsistenten Ergebnisse erbringen. Ebenso wäre es denkbar, dass nicht die PKA selbst, sondern Veränderungen der PKA-Zielmoleküle den Unterschied in der sekretorischen Antwort der Zellen mit verminderter Eny2-Expression vermitteln. Es existiert eine Vielzahl von PKA-Substraten, welche potentiell in den Mechanismus der Insulinsekretion involviert sind (Doyle and Egan, 2007). Unter anderem wird der PKA eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung sekretorischer Granula vom *Reserve-Pool* in den *Releasable-Pool* zugeschrieben (Renstrom et al., 1997), was möglicherweise den stärkeren Effekt eines Eny2-Knockdowns auf die zweite Phase der Insulinsekretion begründet. Überdies spielt die PKA bei dem Prozess der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern über die Aktivierung ER-ständiger IP3-Rezeptoren eine wesentliche Rolle (Tsuboi et al., 2003). Angesichts der gemessenen, charakteristischen Veränderungen intrazellulärer Kalziumkonzentrationen in Eny2-supprimierten Zellen nach

Inkretin-Stimulus (Abb. 3.22 C) erscheint es daher sinnvoll, sich zunächst auf diesen PKA-Signalweg zu konzentrieren.

Wie unter anderem von Kashima et al. (2001) für pankreatische  $\beta$ -Zellen und von Kang et al. (2005) ebenfalls für die INS-1 Zelllinie geschildert, wird etwa die Hälfte der inkretininduzierten Insulinsekretion nicht über den PKA-, sondern über den Epac-Signalweg vermittelt. Warum entgegen diesen Befunden die Verwendung des Epac-Aktivators 8CPT-Me-cAMP, auch in höheren Konzentrationen (Daten nicht gezeigt), in den von uns verwendeten INS-1E-Zellen keinen entsprechenden Effekt erzielte, ist unklar. Einerseits ist dieser Epac-Signaltransduktionsweg in INS-1E-Zellen noch nicht beschrieben und somit unbekannt ob er in die Potenzierung der glukosestimulierten Insulinsekretion durch Inkretine in dieser Zelllinie involviert ist, andererseits könnte ein möglicher Grund dieser Divergenz in einer ungenügenden Membrangängigkeit des Epac-Aktivators liegen. Diese Hypothese wird durch Versuche von Chepurny et al. (2009) gestützt. Sie führten funktionelle Vergleiche mit einer veresterten Form dieses Epac-Aktivators mit der nicht-veresterten Form durch. Dabei war festzustellen, dass der unveresterte Epac-Aktivator erst ab hohen Konzentrationen wirksam wurde, jedoch auch dabei gegenüber dem veresterten Epac-Aktivator eine ungenügende Effizienz zeigte. In einer anderen Studie zeigen Chepurny et al. (2010) überdies, dass der PKA-Inhibitor H-89 ebenfalls Epac-abhängige Effekte inhibiert, da vermutlich die Epac-Aktivität teilweise von einer aktiven PKA abhängt bzw. ebenfalls zur PKA-Aktivität beiträgt (Hatakeyama et al., 2006; Hatakeyama et al., 2007). Dieser Befund würde unser Ergebnis begründen, unter der Annahme der Epac-Signalweg trägt zur inkretinvermittelten Insulinsekretion in INS-1E-Zellen bei, dass es unter H-89 Inkubation zur vollständigen Aufhebung des Inkretin-Effekts kommt. Um der Frage nach der Beteiligung des Epac-Signalwegs an der inkretinabhängigen Sekretionsantwort nachzugehen, sollte daher eine Wiederholung des Experiments unter Anwendung der Ester-Form des Epac-Aktivators erfolgen und zudem die Expression von Epac in den INS-1E-Zellen überprüft werden.

#### **4.2.3 Die siRNA-vermittelte Suppression von Eny2 führt zu morphologischen Veränderungen der INS-1E-Zellen**

Die durch die Inhibierung von Eny2 hervorgerufenen Effekte in INS-1E-Zellen scheinen sehr komplex. In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass eine Unterdrückung der Eny2-Expression neben funktionellen Veränderungen ebenfalls morphologische Zellveränderungen induziert. INS-1E-Zellen präsentieren als Konsequenz eines Eny2-Knockdowns abgerundete Zellkörper mit verschmälerten Zellausläufern. Da die Gestalt einer Zelle wesentlich vom Aktin-Zytoskelett bestimmt wird, ließ die veränderte Zellmorphologie nach Suppression von Eny2 darauf schließen, dass auch das Aktin-Gerüst der INS-1E-

Zellen Veränderungen vorzeigt. Erste diesbezügliche Analysen deuten, sofern sie keine methodisch bedingten Artefakte darstellen, auf eine Aktin-Verdichtung entlang der Zellgrenzen nach Eny2-Knockdown hin, während andere Zellareale scheinbar unverändert bleiben. Es ist bekannt, dass das Aktin-Zytoskelett wesentlich in den Prozess der geregelten Exozytose Insulinhaltiger Granula involviert ist. Li et al. (2004) demonstrieren in ihren Studien an INS-1 Zellen, dass die Destruktion von Aktin-Filamenten eine deutlich verringerte Insulinsekretion nach sich zieht (Li et al., 1994; Li et al., 2004; Zhang et al., 2009). Dem entgegen führt sowohl eine pharmakologisch induzierte Depolarisation als auch Polymerisation der Aktin-Filamente in isolierten Langerhansinseln zu einer Steigerung der Insulinsekretion (Jijakli et al., 2002; Mourad et al., 2010; Thurmond et al., 2003). Diese Diskrepanz begründet sich wahrscheinlich in dem erhöhten Vorkommen insulinhaltiger Granula nahe dem Aktin-Netzwerk unterhalb der Plasmamembran primärer  $\beta$ -Zellen (Li et al., 1994). Weitere Studien zeigen darüber hinaus, dass für die Rekrutierung der sekretorischen Vesikel aus dem Reservepool, während der zweiten Phase der Insulinsekretion, vor allem das Aktin tieferer Zellebenen essentiell ist (Ivarsson et al., 2005; Zhang et al., 2009).

Inwiefern die veränderte Morphologie des Aktin-Gerüsts in Eny2-supprimierten INS-1E-Zellen zum Anstieg der gemessenen Insulinsekretion und damit zum Funktionsunterschied beiträgt, ob sie auch die Erhöhung der sekretorischen Aktivität, vor allem während der zweiten Phase der Insulinsekretion mit bedingt, und ob das Aktin-Zytoskelett infolge einer Eny2-Suppression überhaupt Veränderungen unterzogen wird, muss allerdings erst durch weiterführende Untersuchungen geprüft werden. Dementsprechend wäre vor allem die mikroskopische Darstellung des Aktin-Zytoskeletts mittels konfokalem LSM, insbesondere auch in Kombination mit einer Insulin-Färbung, denkbar.

#### **4.2.4 Modell der INS-1E-Zelllinie**

Im Gegensatz zu Zelllinien zeichnen sich primäre  $\beta$ -Zellen durch einen hohen Differenzierungsgrad aus und wären daher für aussagekräftige Versuchsergebnisse in der Diabetesforschung ein ideales Werkzeug. Dennoch finden sie nur im geringen Umfang Anwendung. Grund dafür ist zum einen eine mangelnde Verfügbarkeit und zum anderen die technisch hohen Anforderungen die ihre Isolierung aber auch ihre Kulturbedingungen erfordern. Sowohl isolierte Langerhansinseln als auch die aus Ihnen, meist durch weiteren enzymatischen Verdau gewonnen, primären  $\beta$ -Zellen weisen außerhalb des Gewebeverbandes eine beschleunigte Seneszenz und dadurch bedingt nur eine geringe Lebensspanne auf. Diese Umstände, zudem die große Zellzahlen erfordernden Analysen, machen den Einsatz von  $\beta$ -Zelllinien unerlässlich. Um jedoch als repräsentatives  $\beta$ -

Zellmodell zu gelten, sollten sich auch solche Zelllinien durch verschiedene Merkmale auszeichnen. Einerseits sollten sie einen hohen Insulingehalt aufweisen und auf physiologische Glukosekonzentrationen mit einer stimulierbaren Insulinsekretion ebenfalls im physiologischen Rahmen reagieren und andererseits sollten sie über entsprechende physiologische Transport- und Signaltransduktionsmechanismen verfügen sowie aus dem gleichen Spenderorganismus entstammen, auf welchen die Versuchsergebnisse bezogen werden sollen. Daneben sollten diese Merkmale über große Passagenspannen nicht verloren gehen. Kriterien, die von allen momentan verfügbaren Insulin-sezernierenden Zelllinien am ehesten die MIN6 (Maus; Ishihara et al., 1993) und die INS-1, bzw. INS-1E (Ratte; Asfari et al., 1992; Merglen et al., 2004) Zelllinien erfüllen. Da unter den beschriebenen  $\beta$ -Zellmodellssystemen ebenfalls keines humanen Ursprungs ist, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Funktion von Eny2 in  $\beta$ -Zellen die Ratten-Insulinomzelllinie INS-1E gewählt. Diese Zelllinie wurde ursprünglich von Merglen et al. (2004) wegen ihres hohen Insulingehalts und der sehr gut erhaltenen glukoseabhängigen Insulinsekretion aus der parentalen INS-1 Zelllinie isoliert. Überdies zeigt sie eine Konstanz dieser Merkmale über viele Passagen. Dennoch ließ sich im Verlauf dieser Arbeit abzeichnen, dass die von uns genutzten INS-1E offenbar nicht alle von Merglen et al. (2004) beschriebenen Eigenschaften erfüllen. So wurden beispielsweise, bei der stabilen konstitutiven Überexpression von Eny2 Zellklone generiert, die in ihrer sekretorischen Antwort auf verschiedene Glukosekonzentrationen sehr variierten. Eine ähnliche Variabilität ist auch für die stabile Transfektion an den parentalen INS-1 Zellen beschrieben, was den polyklonalen Ursprung dieser Zelllinien reflektiert (Hohmeier et al., 2000; Yang et al., 2004). Ebenso konnten wir in unseren Versuchen mit untransfizierten INS-1E-Zellen eine Steigerung der Insulinsekretion bis maximal zu einer Glukosekonzentration von 11,2 mM messen, während Merglen et al. (2004) eine Zunahme der Sekretion von Insulin bis zu einer Glukosekonzentration von 20 mM verzeichnen. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz liegt vermutlich in dem für unsere INS-1E-Zellen nicht mehr nachweisbaren Amplifying Pathway. Dieser stellt jedoch einen wichtigen Teilmechanismus der glukosestimulierten Insulinsekretion dar, womit sein Fehlen schon auf einen Verlust des Differenzierungsgrades der genutzten INS-1E-Zellen hindeuten könnte.

Generell stellt sich bei der Verwendung von isolierten Zellen einer Tierart, wie den von uns verwendeten Ratten-Insulinomzellen, auch die Frage nach der Übertragbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse auf den Gesamtorganismus, bzw. inwieweit daraus Rückschlüsse für eine andere Spezies, wie z.B. dem Menschen, gezogen werden können.

Einerseits gibt es artbedingte Differenzen, wie bereits allein durch die unterschiedliche Anzahl der Insulingene verdeutlicht wird (Steiner et al., 1985). Andererseits zeigen Ratten- und humane  $\beta$ -Zellen jedoch in vieler Hinsicht gemeinsame Charakteristika. So ist

beispielsweise beiden Spezies unter anderem die synergistische Wirkung von Glukose und GLP-1 auf die Insulinsekretion und die dabei involvierten, weitgehend übereinstimmenden Signaltransduktionsmechanismen (Delmeire et al., 2003; Holst, 2002; Zander et al., 2002) oder aber der biphasische Verlauf der Insulinsekretion, gemein (Cerasi, 1975; Curry et al., 1968; Luzi and DeFronzo, 1989).

In welchem Umfange eine Konkordanz zutrifft, lässt sich dennoch immer erst ableiten, wenn analoge Ergebnisse beider Spezies aus vergleichbaren Experimenten vorliegen.

#### 4.2.5 Ausblick

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere der funktionalen Rolle von Eny2 für die Insulinsekretion adulter  $\beta$ -Zellen, bzw. insulinproduzierender Zellen nachgegangen. Dabei konnte erstmalig eine regulatorische Funktion, für das bisher nur an Hefen und Invertebraten beschriebene Protein Eny2, auch für Vertebratenzellen gezeigt werden. Obwohl die erhöhte Expression von Eny2 in  $\beta$ -Zellen im Rahmen der adaptiven Prozesse während der Schwangerschaft eher eine positiv regulatorische Funktion für Eny2 indizierte, zeigen die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, dass Eny2 als negativer Regulator sowohl der glukosestimulierten als auch inkretinvermittelten Insulinsekretion fungiert. Als Teil-Mechanismen, die nach Eny2-Suppression entsprechende insulinsekretionssteigernde Effekte induzieren, konnten wir eine erhöhte glukoseabhängige metabolische Aktivität, aber auch eine gesteigerte Stimulierbarkeit der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie einen verstärkten PKA-Signalweg messen. Welche molekularen Details diese Effekte jedoch im Einzelnen vermitteln, ist aus diesen Ergebnissen noch nicht zu ersehen.

Von Eny2 ist bekannt, dass es überwiegend in nukleär stattfindende Prozesse involviert ist. Von daher stellt sich die Frage nach möglichen Verbindungsmechanismen, die diese Eny2-Funktionen mit dem an INS-1E-Zellen beobachteten Phänotyp nach Eny2-Suppression knüpfen. Vergleichende Expressionsprofile sowie Proteomanalysen von Zellen mit unterschiedlichem Eny2-Gehalt könnten mögliche Ansätze zur Beantwortung dieser Frage darstellen.

Da ausschließlich *in-vitro*-Untersuchungen durchgeführt wurden, ist zudem unklar, inwiefern diese Befunde auch die *in-vivo*-Situation widerspiegeln. Nachfolgende Untersuchungen sollten daher abklären, ob unsere Beobachtungen nur ein Phänomen suboptimal differenzierter INS-1E-Zellen darstellen oder generell auf insulinproduzierende Zellen übertragbar sind. Funktionelle Untersuchungen nach Modulation der Eny2-Expression in anderen insulinsezernierenden Zellen, wie beispielsweise der MIN- oder auch der INS-1-Zelllinie, aber auch an aus Pankreasinseln isolierten primären  $\beta$ -Zellen sowie

---

Untersuchungen im Tiermodell, beispielsweise durch Generierung einer transgenen Maus mit  $\beta$ -zellspezifischem Eny2-Knockdown, wären zur Erforschung dieses Aspektes vorstellbar. Zudem sollten weiterführende Analysen an bisher durchgeführte Versuche anknüpfen, um spezifische Effektor-Moleküle eines Eny2-Knockdowns zu identifizieren, da diese interessante Kandidaten darstellen könnten, von denen sich neue Diabetes-Therapien ableiten ließen.

## 5 Literatur

- Aguilar-Bryan L, Bryan J. 1999. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 20(2):101-135.
- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385(6613):257-260.
- Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. 2011. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem* 57(2):241-254.
- Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M. 2004. Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care* 27(7):1798-1811.
- Ammala C, Ashcroft FM, Rorsman P. 1993. Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* 363(6427):356-358.
- Anderson TR, Hedlund E, Carpenter EM. 2002. Differential Pax6 promoter activity and transcript expression during forebrain development. *Mech Dev* 114(1-2):171-175.
- Andersen FG, Heller RS, Petersen HV, Jensen J, Madsen OD, Serup P. 1999. Pax6 and Cdx2/3 form a functional complex on the rat glucagon gene promoter G1-element. *FEBS Lett* 445(2-3):306-310.
- Andersen FG, Jensen J, Heller RS, Petersen HV, Larsson LI, Madsen OD, Serup P. 1999. Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. *FEBS Lett* 445(2-3):315-320.
- Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. 1993. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 213(2):277-284.
- Araki E, Oyadomari S, Mori M. 2003. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 42(1):7-14.
- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130(1):167-178.
- Ashcroft FM, Gribble FM. 1999. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42(8):903-919.
- Ashcroft FM, Rorsman P. 1989. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54(2):87-143.
- 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. *Dev Biol* 269(2):479-488.

- Bain SC, Prins JB, Hearne CM, Rodrigues NR, Rowe BR, Pritchard LE, Ritchie RJ, Hall JR, Undlien DE, Ronningen KS, et al. 1992. Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. *Nat Genet* 2(3):212-215.
- Barg S, Eliasson L, Renstrom E, Rorsman P. 2002. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca<sup>2+</sup> channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 1:S74-82.
- Bernard C, Berthault MF, Saulnier C, Ktorza A. 1999. Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *Faseb J* 13(10):1195-1205.
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2):474-482.
- Berridge MV, Tan, A.S., McCoy, K. D., Wang, R. 1996. *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts.*: Biochemica.
- Boden G. 2005. Free fatty acids and insulin secretion in humans. *Curr Diab Rep* 5(3):167-170.
- Bonner-Weir S. 2000. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24(3):297-302.
- Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47(6):1033-1040.
- Bouwens L, Rooman I. 2005. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85(4):1255-1270.
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW. 2002. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1:S83-90.
- Briaud I, Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig JF, Lawrence JC, Rhodes CJ. 2005. Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. *J Biol Chem* 280(3):2282-2293.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53(9):1087-1097.
- Britsch S, Krippeit-Drews P, Lang F, Gregor M, Drews G. 1995. Glucagon-like peptide-1 modulates Ca<sup>2+</sup> current but not K<sup>+</sup>ATP current in intact mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207(1):33-39.
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. 1997. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88(4):561-572.

- Burkart V, Kolb H. 1996. Macrophages in islet destruction in autoimmune diabetes mellitus. *Immunobiology* 195(4-5):601-613.
- Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, Maine GN, Wilkinson JC, Mayo MW, Duckett CS. 2005. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 280(23):22222-22232.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1):102-110.
- Cai Z, Wang Y, Yu W, Xiao J, Li Y, Liu L, Zhu C, Tan K, Deng Y, Yuan W, Liu M, Wu X. 2006. hnulp1, a basic helix-loop-helix protein with a novel transcriptional repressive domain, inhibits transcriptional activity of serum response factor. *Biochem Biophys Res Commun* 343(3):973-981.
- Cameron NE, Cotter MA. 1992. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia* 35(11):1011-1019.
- Capito K, Hedekov CJ, Thams P. 1986. Cyclic AMP phosphodiesterase activity in mouse pancreatic islets. Effects of calmodulin and phospholipids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 111(4):533-538.
- Carriere C, Plaza S, Caboche J, Dozier C, Bailly M, Martin P, Saule S. 1995. Nuclear localization signals, DNA binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms. *Cell Growth Differ* 6(12):1531-1540.
- Cerasi E. 1975. Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: some re-evaluations and proposals. *Diabetologia* 11(1):1-13.
- Chalepakis G, Tremblay P, Gruss P. 1992. Pax genes, mutants and molecular function. *J Cell Sci Suppl* 16:61-67.
- Chen YD, Wang S, Sherman A. 2008. Identifying the targets of the amplifying pathway for insulin secretion in pancreatic beta-cells by kinetic modeling of granule exocytosis. *Biophys J* 95(5):2226-2241.
- Chepurny OG, Kelley GG, Dzhura I, Leech CA, Roe MW, Dzhura E, Li X, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. 2010. PKA-dependent potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM in human islets of Langerhans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3):E622-633.
- Chepurny OG, Leech CA, Kelley GG, Dzhura I, Dzhura E, Li X, Rindler MJ, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. 2009. Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *J Biol Chem* 284(16):10728-10736.
- Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, Martinez A, Maenhaut C, Bos JL, Genieser HG, Doskeland SO. 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* 278(37):35394-35402.
- Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC. 1988. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and

- exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9(4):151-159.
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, Smith J, Gruss P, Serup P, Mansouri A. 2005. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* 132(13):2969-2980.
- Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P. 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17(20):2591-2603.
- Cooper DM. 2003. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* 375(Pt 3):517-529.
- Cuenca-Bono B, Garcia-Molinero V, Pascual-Garcia P, Garcia-Oliver E, Llopis A, Rodriguez-Navarro S. 2010. A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism. *BMC Cell Biol* 11:19.
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. 1968. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83(3):572-584.
- Curto GG, Lara JM, Parrilla M, Aijon J, Velasco A. 2007. Modifications of the retina neuronal populations of the heterozygous mutant small eye mouse, the Sey(Dey). *Brain Res* 1127(1):163-176.
- Czerny T, Schaffner G, Busslinger M. 1993. DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7(10):2048-2061.
- Czerny T, Busslinger M. 1995. DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* 15(5):2858-2871.
- Dahlen E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. 1998. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 160(7):3585-3593.
- Daneman D. 2006. Type 1 diabetes. *Lancet* 367(9513):847-858.
- Davies JM. 1994. *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, Great Britain.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396(6710):474-477.
- Delmeire D, Flamez D, Hinke SA, Cali JJ, Pipeleers D, Schuit F. 2003. Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* 46(10):1383-1393.
- Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF. 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53(3):624-632.

- Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpeel MJ, Bertrand F, Caron M, Atfi A, Cherqui G, Capeau J. 2000. Insulin-mediated cell proliferation and survival involve inhibition of c-Jun N-terminal kinases through a phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1-dependent pathway. *Endocrinology* 141(3):922-931.
- Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E, Brubaker PL. 2001. Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology* 142(1):37-42.
- Dohrmann C, Gruss P, Lemaire L. 2000. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 92(1):47-54.
- Dominguez M, Ferres-Marco D, Gutierrez-Avino FJ, Speicher SA, Beneyto M. 2004. Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 36(1):31-39.
- Donath MY, Halban PA. 2004. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47(3):581-589.
- Doyle ME, Egan JM. 2007. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* 113(3):546-593.
- Dozier C, Carriere C, Grevin D, Martin P, Quatannens B, Stehelin D, Saule S. 1993. Structure and DNA-binding properties of Pax-QNR, a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth Differ* 4(4):281-289.
- Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. 2000. Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *Embo J* 19(10):2292-2303.
- Edlund H. 2001. Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* 44(9):1071-1079.
- Edlund H. 2002. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3(7):524-532.
- Efendic S, Grill V, Luft R, Wajngot A. 1988. Low insulin response: a marker of prediabetes. *Adv Exp Med Biol* 246:167-174.
- Ehnes JA, Ellingsgaard H, Boni-Schnetzler M, Donath MY. 2009. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. *Arch Physiol Biochem* 115(4):240-247.
- Ehnes JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56(9):2356-2370.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-498.
- Eliasson L, Ma X, Renstrom E, Barg S, Berggren PO, Galvanovskis J, Gromada J, Jing X, Lundquist I, Salehi A, Sewing S, Rorsman P. 2003. SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol* 121(3):181-197.

- Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P, Rorsman P. 1997. Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503 (Pt 2):399-412.
- Ellisdon AM, Jani D, Kohler A, Hurt E, Stewart M. 2009. Structural basis for the interaction between yeast Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) complex components Sgf11 and Sus1. *J Biol Chem* 285(6):3850-3856.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL. 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* 4(11):901-906.
- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. 1994. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8(17):2022-2034.
- Favor J, Gloeckner CJ, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Sandulache R, Saule S, Zaus I. 2008. Relationship of Pax6 activity levels to the extent of eye development in the mouse, *Mus musculus*. *Genetics* 179(3):1345-1355.
- Favor J, Peters H, Hermann T, Schmahl W, Chatterjee B, Neuhauser-Klaus A, Sandulache R. 2001. Molecular characterization of Pax6(2Neu) through Pax6(10Neu): an extension of the Pax6 allelic series and the identification of two possible hypomorph alleles in the mouse *Mus musculus*. *Genetics* 159(4):1689-1700.
- Fehmann HC, Habener JF. 1992. Insulinotropic glucagonlike peptide-I(7-37)/(7-36)amide A new incretin hormone. *Trends Endocrinol Metab* 3(5):158-163.
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. 1991. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113(2):503-514.
- Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. 1966. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* 45(9):1487-1502.
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328(10):697-702.
- Gauthier BR, Wiederkehr A, Baquie M, Dai C, Powers AC, Kerr-Conte J, Pattou F, MacDonald RJ, Ferrer J, Wollheim CB. 2009. PDX1 deficiency causes mitochondrial dysfunction and defective insulin secretion through TFAM suppression. *Cell Metab* 10(2):110-118.
- Geiger B, Volk T, Volberg T. 1985. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J Cell Biol* 101(4):1523-1531.
- Gembal M, Gilon P, Henquin JC. 1992. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89(4):1288-1295.
- Gerich JE. 2003. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 78(4):447-456.
- Gierl MS, Karoulias N, Wende H, Strehle M, Birchmeier C. 2006. The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. *Genes Dev* 20(17):2465-2478.

- Goke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Goke B. 1993. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268(26):19650-19655.
- Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. 1995. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95(5):2195-2204.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268(5218):1766-1769.
- Gotz M, Stoykova A, Gruss P. 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21(5):1031-1044.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4):1607-1611.
- Graw J, Loster J, Puk O, Munster D, Haubst N, Soewarto D, Fuchs H, Meyer B, Nurnberg P, Pretsch W, Selby P, Favor J, Wolf E, Hrabe de Angelis M. 2005. Three novel Pax6 alleles in the mouse leading to the same small-eye phenotype caused by different consequences at target promoters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(12):4671-4683.
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM. 1998. MgATP activates the beta cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7185-7190.
- Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. 1995. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121(5):1433-1442.
- Grindley JC, Hargett LK, Hill RE, Ross A, Hogan BL. 1997. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6<sup>Sey-1Neu</sup> mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech Dev* 64(1-2):111-126.
- Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renstrom E, Frokjaer-Jensen J, Wulff BS, Rorsman P. 1995. Glucagon-like peptide I increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting beta TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes* 44(7):767-774.
- Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 83(1):69-78.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129(10):2447-2457.
- Guardado-Mendoza R, Davalli AM, Chavez AO, Hubbard GB, Dick EJ, Majluf-Cruz A, Tene-Perez CE, Goldschmidt L, Hart J, Perego C, Comuzzie AG, Tejero ME, Finzi G, Placidi C, La Rosa S, Capella C, Halff G, Gastaldelli A, DeFronzo RA, Folli F. 2009. Pancreatic islet amyloidosis, beta-cell apoptosis, and alpha-cell proliferation are

- determinants of islet remodeling in type-2 diabetic baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33):13992-13997.
- Guest PC, Abdel-Halim SM, Gross DJ, Clark A, Poitout V, Amaria R, Ostenson CG, Hutton JC. 2002. Proinsulin processing in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *J Endocrinol* 175(3):637-647.
- Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Deriaz N, Thorens B. 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17(3):327-330.
- Hamasaki A, Yamada Y, Kurose T, Ban N, Nagashima K, Takahashi A, Fujimoto S, Shimono D, Fujiwara M, Toyokuni S, Seino Y, Inagaki N. 2007. Adult pancreatic islets require differential pax6 gene dosage. *Biochem Biophys Res Commun* 353(1):40-46.
- Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H. 1989. Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32(2):126-134.
- Hatakeyama H, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H, Takahashi N. 2006. Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. *J Physiol* 570(Pt 2):271-282.
- Hatakeyama H, Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H. 2007. Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in mouse beta-cells. *J Physiol* 582(Pt 3):1087-1098.
- Haubst N, Berger J, Radjendirane V, Graw J, Favor J, Saunders GF, Stoykova A, Gotz M. 2004. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development* 131(24):6131-6140.
- Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P. 2005. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* 286(1):217-224.
- Heller RS, Stoffers DA, Liu A, Schedl A, Crenshaw EB, 3rd, Madsen OD, Serup P. 2004. The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Dev Biol* 268(1):123-134.
- Henquin JC. 1995. [Hierarchy of control mechanisms of insulin secretion by glucose]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 150(3-4):156-161; discussion 161-153.
- Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Jonas JC. 2002. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1:S60-67.
- Henquin JC. 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49(11):1751-1760.
- Henquin JC. 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52(5):739-751.
- Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. 2003. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 33(9):742-750.
- Herrera PL. 2000. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127(11):2317-2322.

- Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vassalli JD. 1991. Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 113(4):1257-1265.
- Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354(6354):522-525.
- Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB. 2000. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49(3):424-430.
- Holst JJ. 2002. Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6):430-441.
- Holz GG. 2004. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53(1):5-13.
- Holz GG, Leech CA, Heller RS, Castonguay M, Habener JF. 1999. cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca<sup>2+</sup> signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem* 274(20):14147-14156.
- Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF. 1993. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *Nature* 361(6410):362-365.
- Holz GG, Leech CA, Habener JF. 1995. Activation of a cAMP-regulated Ca<sup>2+</sup>-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270(30):17749-17757.
- Huang S, Czech MP. 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5(4):237-252.
- Hussain MA, Habener JF. 1999. Glucagon gene transcription activation mediated by synergistic interactions of pax-6 and cdx-2 with the p300 co-activator. *J Biol Chem* 274(41):28950-28957.
- Hussain MA, Lee J, Miller CP, Habener JF. 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. *Mol Cell Biol* 17(12):7186-7194.
- Hyoty H, Leinikki P, Reunanen A, Ilonen J, Surcel HM, Rilva A, Kaar ML, Huupponen T, Hakulinen A, Makela AL, et al. 1988. Mumps infections in the etiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetes Res* 9(3):111-116.
- Iida Y, Senda T, Matsukawa Y, Onoda K, Miyazaki JI, Sakaguchi H, Nimura Y, Hidaka H, Niki I. 1997. Myosin light-chain phosphorylation controls insulin secretion at a proximal step in the secretory cascade. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1):E782-789.
- Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, Moriwaki M, Itoh N, Yamamoto K, Iwahashi H, Yamagata K, Waguri M, Nanmo T, Uno S, Nakajima H, Namba M, Kawata S, Miyagawa JI, Matsuzawa Y. 2001. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 50(6):1269-1273.

- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49(11):1939-1945.
- Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, 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.
- Ishihara H, Wang H, Drewes LR, Wollheim CB. 1999. Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest* 104(11):1621-1629.
- Ivarsson R, Jing X, Waselle L, Regazzi R, Renstrom E. 2005. Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion. *Traffic* 6(11):1027-1035.
- Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renstrom E, Schuit FC. 2005. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54(7):2132-2142.
- Jaikaran ET, Clark A. 2001. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1537(3):179-203.
- Jani D, Lutz S, Marshall NJ, Fischer T, Kohler A, Ellisdon AM, Hurt E, Stewart M. 2009. Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. *Mol Cell* 33(6):727-737.
- Janjic D, Wollheim CB. 1992. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* 35(5):482-485.
- Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD, Newgard CB. 2008. Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6):E1287-1297.
- Jijakli H, Zhang HX, Dura E, Ramirez R, Sener A, Malaisse WJ. 2002. Effects of cytochalasin B and D upon insulin release and pancreatic islet cell metabolism. *Int J Mol Med* 9(2):165-172.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371(6498):606-609.
- Jun S, Desplan C. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122(9):2639-2650.
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106(4):473-481.
- Kahn SE. 2000. The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 108 Suppl 6a:2S-8S.
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. 1999. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48(2):241-253.
- Kajimoto Y, Kaneto H. 2004. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1011:168-176.

- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. 2001. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev* 15(10):1272-1286.
- Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA, Holz GG. 2006. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 573(Pt 3):595-609.
- Kang G, Chepurny OG, Rindler MJ, Collis L, Chepurny Z, Li WH, Harbeck M, Roe MW, Holz GG. 2005. A cAMP and Ca<sup>2+</sup> coincidence detector in support of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in mouse pancreatic beta cells. *J Physiol* 566(Pt 1):173-188.
- Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK. 2007. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science* 318(5851):806-809.
- Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. 2001. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* 276(49):46046-46053.
- Katz LS, Gosmain Y, Marthinet E, Philippe J. 2009. Pax6 regulates the proglucagon processing enzyme PC2 and its chaperone 7B2. *Mol Cell Biol* 29(8):2322-2334.
- Kim C, Newton KM, Knopp RH. 2002. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 25(10):1862-1868.
- Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS. 2010. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 16(7):804-808.
- Kim SK, Novak RF. 2007. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther* 113(1):88-120.
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO. 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63(3):579-590.
- Knepel W, Jepeal L, Habener JF. 1990. A pancreatic islet cell-specific enhancer-like element in the glucagon gene contains two domains binding distinct cellular proteins. *J Biol Chem* 265(15):8725-8735.
- Kopytova DV, Krasnov AN, Orlova AV, Gurskiy DY, Nabirochkina EN, Georgieva SG, Shidlovskii YV. 2009. ENY2: couple, triple.more? *Cell Cycle* 9(3):479-481.
- Kowluru A. 2003. Regulatory roles for small G proteins in the pancreatic beta-cell: lessons from models of impaired insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4):E669-684.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK. 1998. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 12(23):3752-3763.
- Kulkarni RN. 2004. The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36(3):365-371.

- Kurshakova M, Maksimenko O, Golovnin A, Pulina M, Georgieva S, Georgiev P, Krasnov A. 2007. Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* 27(2):332-338.
- Lang J. 1999. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259(1-2):3-17.
- Langdon RC, Burr T, Pagan-Westphal S, Hochschild A. 2001. A chimeric activator of transcription that uses two DNA-binding domains to make simultaneous contact with pairs of recognition sites. *Mol Microbiol* 41(4):885-896.
- Lee YH, White MF. 2004. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res* 27(4):361-370.
- Leech CA, Habener JF. 1997. Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *J Biol Chem* 272(29):17987-17993.
- Leung YM, Kwan EP, Ng B, Kang Y, Gaisano HY. 2007. SNAREing voltage-gated K<sup>+</sup> and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocr Rev* 28(6):653-663.
- Li G, Rungger-Brandle E, Just I, Jonas JC, Aktories K, Wollheim CB. 1994. Effect of disruption of actin filaments by *Clostridium botulinum* C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* 5(11):1199-1213.
- Li J, Luo R, Kowluru A, Li G. 2004. Novel regulation by Rac1 of glucose- and forskolin-induced insulin secretion in INS-1 beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(5):E818-827.
- Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. 2002. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8(8):375-384.
- Lingohr MK, Dickson LM, McCuaig JF, Hugl SR, Twardzik DR, Rhodes CJ. 2002. Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 51(4):966-976.
- Lu D, Mulder H, Zhao P, Burgess SC, Jensen MV, Kamzolova S, Newgard CB, Sherry AD. 2002. <sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2708-2713.
- Ludvigsson J. 2006. Why diabetes incidence increases--a unifying theory. *Ann N Y Acad Sci* 1079:374-382.
- Luzi L, DeFronzo RA. 1989. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol* 257(2 Pt 1):E241-246.
- MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA. 2005. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1):E1-15.
- MacDonald PE, Wang X, Xia F, El-kholy W, Targonsky ED, Tsushima RG, Wheeler MB. 2003. Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K<sup>+</sup> currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 278(52):52446-52453.

- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. 1997. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27(4):325-351.
- Magnaghi P, Roberts C, Lorain S, Lipinski M, Scambler PJ. 1998. HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet* 20(1):74-77.
- Maine GN, Burstein E. 2007. COMMD proteins and the control of the NF kappa B pathway. *Cell Cycle* 6(6):672-676.
- Maine GN, Burstein E. 2007. COMMD proteins: COMMing to the scene. *Cell Mol Life Sci* 64(15):1997-2005.
- Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS. 1999. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 23(3):323-328.
- Malide D, Seidah NG, Chretien M, Bendayan M. 1995. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *J Histochem Cytochem* 43(1):11-19.
- Mandrup-Poulsen T. 1996. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39(9):1005-1029.
- Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO. 2001. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med* 345(14):1036-1040.
- Matschinsky FM. 1996. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45(2):223-241.
- Matschinsky FM, Collins HW. 1997. Essential biochemical design features of the fuel-sensing system in pancreatic beta-cells. *Chem Biol* 4(4):249-257.
- McKinnon CM, Docherty K. 2001. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44(10):1203-1214.
- Melloul D. 2004. Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Ann N Y Acad Sci* 1014:28-37.
- Melloul D, Marshak S, Cerasi E. 2002. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45(3):309-326.
- Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. 2004. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145(2):667-678.
- Mishra R, Gorlov IP, Chao LY, Singh S, Saunders GF. 2002. PAX6, paired domain influences sequence recognition by the homeodomain. *J Biol Chem* 277(51):49488-49494.
- Mojsov S, Weir GC, Habener JF. 1987. Insulintropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79(2):616-619.

- Moller CJ, Christgau S, Williamson MR, Madsen OD, Niu ZP, Bock E, Baekkeskov S. 1992. Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas, and insulinomas. *Mol Endocrinol* 6(8):1332-1342.
- Mourad NI, Nenquin M, Henquin JC. 2010. Metabolic amplifying pathway increases both phases of insulin secretion independently of beta-cell actin microfilaments. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(2):C389-398.
- Muoio DM, Newgard CB. 2008. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3):193-205.
- Murtaugh LC. 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134(3):427-438.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4):279-289.
- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11(18):2323-2334.
- Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. 1974. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2(7885):864-866.
- Newgard CB, McGarry JD. 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64:689-719.
- O'Rahilly S. 2009. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462(7271):307-314.
- Odegaard ML, Joseph JW, Jensen MV, Lu D, Ilkayeva O, Ronnebaum SM, Becker TC, Newgard CB. 2010. The mitochondrial 2-oxoglutarate carrier is part of a metabolic pathway that mediates glucose- and glutamine-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 285(22):16530-16537.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122(3):983-995.
- Olsson M, Durbeek M, Ekblom P, Hjalt T. 2002. Nulp1, a novel basic helix-loop-helix protein expressed broadly during early embryonic organogenesis and prominently in developing dorsal root ganglia. *Cell Tissue Res* 308(3):361-370.
- Orskov C. 1992. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia* 35(8):701-711.
- Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeldt J, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR, Polonsky KS. 2004. Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in beta1RKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(1):E41-49.
- Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, Gehring WJ, Wuthrich K. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *Embo J* 9(10):3085-3092.

- Panten U, Rustenbeck I. 2008. Fuel-induced amplification of insulin secretion in mouse pancreatic islets exposed to a high sulfonylurea concentration: role of the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio. *Diabetologia* 51(1):101-109.
- Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL. 1995. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136(5):2013-2021.
- Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. 1992. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130(3):1459-1466.
- Pascual-Garcia P, Govind CK, Queralt E, Cuenca-Bono B, Llopis A, Chavez S, Hinnebusch AG, Rodriguez-Navarro S. 2008. *Sus1* is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev* 22(20):2811-2822.
- Pascual-Garcia P, Rodriguez-Navarro S. 2009. A tale of coupling, *Sus1* function in transcription and mRNA export. *RNA Biol* 6(2):141-144.
- Perna AF, Fadda GZ, Massry SG. 1991. Inhibition of phosphofructokinase activity in pancreatic islets in phosphate depletion. *Miner Electrolyte Metab* 17(1):8-11.
- Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD. 1994. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10465-10469.
- Petri A, Ahnfelt-Ronne J, Frederiksen KS, Edwards DG, Madsen D, Serup P, Fleckner J, Heller RS. 2006. The effect of neurogenin3 deficiency on pancreatic gene expression in embryonic mice. *J Mol Endocrinol* 37(2):301-316.
- Philippe J, Morel C, Cordier-Bussat M. 1995. Islet-specific proteins interact with the insulin-response element of the glucagon gene. *J Biol Chem* 270(7):3039-3045.
- Picchi A, Capobianco S, Qiu T, Focardi M, Zou X, Cao JM, Zhang C. 2010. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: A review. *World J Cardiol* 2(11):377-390.
- Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS. 1998. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47(3):358-364.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29(4):436-467.
- Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Benkhalifa S, Martin P, Felder-Schmittbuhl MP, Saule S. 2001. Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J Biol Chem* 276(38):35751-35760.
- Polonsky KS. 2000. Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S29-31.
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2924-2929.

- Quinn JC, West JD, Hill RE. 1996. Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev* 10(4):435-446.
- Renstrom E, Eliasson L, Rorsman P. 1997. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 502 (Pt 1):105-118.
- Rhodes CJ. 2005. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307(5708):380-384.
- Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70(3):389-399.
- 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. *J Biol Chem* 274(7):4124-4132.
- Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, Becker TC, Sherry AD, Newgard CB, Jensen MV. 2006. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(41):30593-30602.
- Rorsman P. 1997. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40(5):487-495.
- Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S. 2000. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15:72-77.
- Rorsman P, Renstrom E. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(8):1029-1045.
- Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. 1994. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):3242-3246.
- Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, Charpentier G, Dina C, Durand E, Elliott P, Hadjadj S, Jarvelin MR, Laitinen J, Lauritzen T, Marre M, Mazur A, Meyre D, Montpetit A, Pisinger C, Posner B, Poulsen P, Pouta A, Prentki M, Ribel-Madsen R, Ruokonen A, Sandbaek A, Serre D, Tichet J, Vaxillaire M, Wojtaszewski JF, Vaag A, Hansen T, Polychronakos C, Pedersen O, Froguel P, Sladek R. 2009. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 41(10):1110-1115.
- Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11(13):1662-1673.
- Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T. 1992. Dual functional role of membrane depolarization/Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41(4):438-443.
- Sato Y, Anello M, Henquin JC. 1999. Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in beta cells. *Endocrinology* 140(5):2252-2257.

- Sato Y, Henquin JC. 1998. The K<sup>+</sup>-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* 47(11):1713-1721.
- Sato Y, Nenquin M, Henquin JC. 1998. Relative contribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms to the regulation of insulin secretion by glucose. *FEBS Lett* 421(2):115-119.
- Schwanstecher C, Dickel C, Panten U. 1994. Interaction of tolbutamide and cytosolic nucleotides in controlling the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in mouse beta-cells. *Br J Pharmacol* 111(1):302-310.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316(5829):1341-1345.
- Seino S. 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 61:337-362.
- Sheetz MJ, King GL. 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Jama* 288(20):2579-2588.
- Shimoike T, Inoguchi T, Umeda F, Nawata H, Kawano K, Ochi H. 2000. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Metabolism* 49(8):1030-1035.
- Singh S, Mishra R, Arango NA, Deng JM, Behringer RR, Saunders GF. 2002. Iris hypoplasia in mice that lack the alternatively spliced Pax6(5a) isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):6812-6815.
- Singh S, Stellrecht CM, Tang HK, Saunders GF. 2000. Modulation of PAX6 homeodomain function by the paired domain. *J Biol Chem* 275(23):17306-17313.
- Slack JM. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121(6):1569-1580.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130):881-885.
- Smart NG, Apelqvist AA, Gu X, Harmon EB, Topper JN, MacDonald RJ, Kim SK. 2006. Conditional expression of Smad7 in pancreatic beta cells disrupts TGF-beta signaling and induces reversible diabetes mellitus. *PLoS Biol* 4(2):e39.
- Sorenson RL, Brelje TC. 1997. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29(6):301-307.
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386(6623):399-402.

- Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. 1996. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21(2):280-285.
- 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.
- Stanojevic V, Habener JF, Thomas MK. 2004. Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* 145(6):2918-2928.
- Steen H, Lindholm D. 2008. Nuclear localized protein-1 (Nulp1) increases cell death of human osteosarcoma cells and binds the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biochem Biophys Res Commun* 366(2):432-437.
- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. 1985. Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet* 19:463-484.
- Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17(2):138-139.
- Suchindran S, Vana AM, Shaffer RA, Alcaraz JE, McCarthy JJ. 2009. Racial differences in the interaction between family history and risk factors associated with diabetes in the National Health and Nutritional Examination Survey, 1999-2004. *Genet Med* 11(7):542-547.
- Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA. 2009. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* 76(3):216-226.
- Tang HK, Singh S, Saunders GF. 1998. Dissection of the transactivation function of the transcription factor encoded by the eye developmental gene PAX6. *J Biol Chem* 273(13):7210-7221.
- Targher G, Alberiche M, Zenere MB, Bonadonna RC, Muggeo M, Bonora E. 1997. Cigarette smoking and insulin resistance in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82(11):3619-3624.
- Taylor JJ, Wang T, Kroll KL. 2006. Tcf- and Vent-binding sites regulate neural-specific geminin expression in the gastrula embryo. *Dev Biol* 289(2):494-506.
- Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. 1993. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development* 118(4):1031-1039.
- Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. 1993. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42(11):1678-1682.
- Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE. 2003. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol* 17(4):732-742.
- Treisman J, Harris E, Desplan C. 1991. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5(4):594-604.

- Tsuboi T, da Silva Xavier G, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. 2003. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J* 369(Pt 2):287-299.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadi A, Nithiyanthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423(6939):506-511.
- Unger RH, Zhou YT. 2001. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 50 Suppl 1:S118-121.
- Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. 1978. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 85(11):818-820.
- Van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, Mol JN, Stuitje AR. 1990. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol* 14(4):457-466.
- Veerababu G, Tang J, Hoffman RT, Daniels MC, Hebert LF, Jr., Crook ED, Cooksey RC, McClain DA. 2000. Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 49(12):2070-2078.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103(7):931-943.
- Walther C, Gruss P. 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113(4):1435-1449.
- Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. 1999. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* 140(10):4904-4907.
- Wasmuth HE, Kolb H. 2000. Cow's milk and immune-mediated diabetes. *Proc Nutr Soc* 59(4):573-579.
- White MF. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(3):E413-422.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107(1-3):63-69.
- Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F. 2004. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 52(3):301-310.

- Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C. 1993. Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7(11):2120-2134.
- Wilson DS, Guenther B, Desplan C, Kuriyan J. 1995. High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell* 82(5):709-719.
- Wollheim CB, Maechler P. 2002. Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 51 Suppl 1:S37-42.
- Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ. 2002. Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 277(51):49676-49684.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384(6608):458-460.
- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI, et al. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384(6608):455-458.
- Yang S, Fransson U, Fagerhus L, Holst LS, Hohmeier HE, Renstrom E, Mulder H. 2004. Enhanced cAMP protein kinase A signaling determines improved insulin secretion in a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *Mol Endocrinol* 18(9):2312-2320.
- Yasuda T, Kajimoto Y, Fujitani Y, Watada H, Yamamoto S, Watarai T, Umayahara Y, Matsuhisa M, Gorogawa S, Kuwayama Y, Tano Y, Yamasaki Y, Hori M. 2002. PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes* 51(1):224-230.
- Yoon JW, Onodera T, Jenson AB, Notkins AL. 1978. Virus-induced diabetes mellitus. XI. Replication of coxsackie B3 virus in human pancreatic beta cell cultures. *Diabetes* 27(7):778-781.
- Yoon JW, Onodera T, Notkins AL. 1978. Virus-induced diabetes mellitus. XV. Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackie virus B4. *J Exp Med* 148(4):1068-1080.
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S. 2003. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2300-2308.
- Yu Z, Jin T. 2009. New insights into the role of cAMP in the production and function of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Cell Signal* 22(1):1-8.
- Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32(Pt3):416-420.
- Zamir E, Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114(Pt 20):3583-3590.

- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. 2002. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359(9309):824-830.
- Zawalich WS, Yamazaki H, Zawalich KC, Cline G. 2004. Comparative effects of amino acids and glucose on insulin secretion from isolated rat or mouse islets. *J Endocrinol* 183(2):309-319.
- Zhang J, Luo R, Wu H, Wei S, Han W, Li G. 2009. Role of type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in insulin secretion, glucose metabolism, and membrane potential in INS-1 beta-cells. *Endocrinology* 150(5):2127-2135.
- Zhao J, Araki N, Nishimoto SK. 1995. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 155(2):159-165.
- Zhao Y, Lang G, Ito S, Bonnet J, Metzger E, Sawatsubashi S, Suzuki E, Le Guezennec X, Stunnenberg HG, Krasnov A, Georgieva SG, Schule R, Takeyama K, Kato S, Tora L, Devys D. 2008. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 29(1):92-101.
- Zick Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* 11(11):437-441.
- Zimmerman B, Arnold M, Ulmer J, Blummel J, Besser A, Spatz JP, Geiger B. 2004. Formation of focal adhesion-stress fibre complexes coordinated by adhesive and non-adhesive surface domains. *IEE Proc Nanobiotechnol* 151(2):62-66.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865):782-787.

## 6 Anhang

### Publikationen

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

Dahlhoff M, Dames PM, Lechner A, Herbach N, van Burck L, Wanke R, Wolf E, Schneider MR. 2009. Betacellulin overexpression in transgenic mice improves glucose tolerance and enhances insulin secretion by isolated islets in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 299(2):188-193.

Dames P, Puff R, Weise M, Parhofer KG, Goke B, Gotz M, Graw J, Favor J, Lechner A. 2010. Relative roles of the different Pax6 domains for pancreatic alpha cell development. *BMC Dev Biol* 10(1):39.

Puff R, Dames P, Weise M, Goke B, Parhofer K, Lechner A. 2010. No non-redundant function of suppressor of cytokine signaling 2 in insulin producing beta-cells. *Islets* 2(4):252-257.

Puff R, Dames P, Weise M, Goke B, Seissler J, Parhofer KG, Lechner A. 2011. Reduced proliferation and a high apoptotic frequency of pancreatic beta cells contribute to genetically-determined diabetes susceptibility of db/db BKS mice. *Horm Metab Res* 43(5):306-311.

Dames P, Weise M, Puff R, Goke B, Parhofer KG, Seissler J, Lechner A. 2011. Suppression of the nuclear factor Eny2 redifferentiates poorly functioning ins-1E insulinoma cells. (submitted)

Kongressbeiträge:

Dames P, Puff R, Weise M, Parhofer KG, Goke B, Gotz M, Graw J, Favor J, Lechner A. Die beiden DNA-Bindungsdomänen des Transkriptionsfaktors Pax6 haben unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des endokrinen Pankreas. 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 2008, München (Vortrag)

## **Lebenslauf**

## Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Angelika Böttger für die Betreuung meiner Dissertation als Vertreter der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums in Großhadern / München bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Burkhard Göke.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Andreas Lechner für die sehr gute Betreuung, aber auch für die Bereitstellung des interessanten Themas der Arbeit, für seine Anregungen, seine Unterstützung, Hilfe, Ideen, Vorschläge sowie für die stets freundlichen Gespräche.

Bei meiner Kollegin Frau Michaela Weise, welche mir überdies zu einer sehr guten Freundin wurde, möchte ich mich von ganzen Herzen für ihre Unterstützung, Hilfe und die zahlreichen aufmunternden Worte während meiner gesamten Arbeit bedanken. Sie bereicherte die Laborarbeit jeden Tag mit Spaß und Freude.

Allen weiteren Kollegen und Mitgliedern der Medizinischen Klinik II danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihren Beitrag den Arbeitsalltag auf die ein oder andere Art und Weise aufzulockern.

Mein allerherzlichster Dank gilt jedoch meiner lieben Familie, die mich stets unterstützte und immer für mich da ist.

## ***Erklärung***

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit selbstständig und einzig unter der Benutzung der dargelegten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Potsdam, November 2011

---

Petra Dames