

Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Deutsches Diabetes-Zentrum

Klinische Abteilung

Labor für molekulare Endokrinologie

**Untersuchungen zur Regulation der Genexpression des
diabetes-assoziierten Autoantigens IA-2 in primären Inseln
und INS-1 Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Holger Steinbrenner

aus Gotha

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Gerd Fischer
Prodekan:	Prof. Dr. rer. nat. Hans-Dieter Höltje
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 06. 2002

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum, dem Leiter der Klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstituts, danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen und für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Jochen Seißler für die interessante Aufgabenstellung, seine tatkräftige Unterstützung der Arbeit und viele konstruktive Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. med. Kristian Löbner vom Kings-College London möchte ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit bei der Untersuchung der IA-2-Regulation in primären Inseln und für viele interessante Diskussionen danken.

Frau Ulrike Wohlrab möchte ich für die exzellente und freundliche Unterstützung in der Zellkultur und bei anderen Labortätigkeiten danken.

Frau Tam Nguyen, Frau Dr. rer. nat. Monika Herten und Herrn Gerald Reindl aus unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit, freundliche Unterstützung und anregende Diskussionen danken.

Frau Waltraud Fingberg aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Hubert Kolb danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der Etablierung des Assays zur Messung von Stickstoffmonoxid.

Herrn Karsten Dannehl aus der biometrischen Abteilung des DDFI danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Helga Gleichmann, Prof. Dr. med. Hans Hauner und Prof. Dr. rer. nat. Hubert Kolb aus dem Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut für ihre Hilfsbereitschaft bei gelegentlichen Fragen und Problemen sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern und allen meinen Freunden für ihre Anteilnahme und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. DER TYP 1 DIABETES.....	1
1.2. AUTOANTIGENE BEIM TYP 1 DIABETES	2
1.2.1. IA-2	3
1.2.1.1. Proteinstruktur	3
1.2.1.2. Genomische Struktur	5
1.2.1.3. Expression.....	6
1.2.1.4. Autoantikörper gegen IA-2	6
1.2.1.5. T-Zellreaktivität gegen IA-2.....	9
1.2.2. Insulin	10
1.2.3. Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD).....	11
1.2.4. Andere diabetes-assoziierte Autoantigene	12
1.3. DIE ROLLE VON PROINFLAMMATORISCHEN ZYTOKINEN BEI DER PATHOGENESE EINES TYP 1 DIABETES	14
1.3.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β)	14
1.3.2. Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF- α).....	15
1.3.3. Interferon-gamma (IFN- γ)	16
2. FRAGESTELLUNG	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. MATERIAL	19
3.1.1. Betazell-Linie und Versuchstiere	19
3.1.1.1. Betazell-Linie	19
3.1.1.2. Versuchstiere	19
3.1.2. Reagenzien.....	20
3.1.3. Medien.....	23
3.1.4. Puffer und Stammlösungen.....	24
3.1.5. Geräte	27
3.1.6. Verbrauchsmaterial	28
3.2. METHODEN.....	29
3.2.1. Kultivierung und Stimulation der INS-1 Zellen.....	29
3.2.1.1. Kultivierung der INS-1 Zellen.....	29
3.2.1.2. Stimulation der INS-1 Zellen.....	29

3.2.2. Isolierung, Kultivierung und Stimulation von pankreatischen Inseln.....	30
3.2.2.1. Isolierung der pankreatischen Inseln aus Ratten.....	30
3.2.2.2. Kultivierung und Stimulation der pankreatischen Inseln.....	30
3.2.3. Bestimmung der metabolischen Aktivität der INS-1 Zellen	31
3.2.4. Bestimmung von Insulin.....	31
3.2.5. Bestimmung von Nitrit.....	32
3.2.6. Grundlegende molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.6.1. Isolierung der RNA aus INS-1 Zellen und primären Inseln	32
3.2.6.2. Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese).....	33
3.2.6.3. Klonierung der Template cDNA-Fragmente	34
3.2.6.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.2.6.3.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
3.2.6.3.3. Ligation der DNA-Fragmente mit pGEM-Vektoren.....	36
3.2.6.3.4. Transformation von E. coli Bakterien.....	37
3.2.6.3.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien.....	38
3.2.6.4. DNA-Sequenzierung.....	38
3.2.7. Northern Blot Analyse	39
3.2.7.1. Elektrophorese und Blotten der RNA.....	39
3.2.7.2. Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	40
3.2.7.3. Hybridisierung und Detektion der mRNA.....	41
3.2.8. Kompetitive RT-PCR.....	42
3.2.8.1. Herstellung der internen Standards für die kompetitive PCR	42
3.2.8.2. Quantifizierung der IA-2 mRNA mittels kompetitiver RT-PCR.....	45
3.2.9. Real-Time PCR (LightCycler-PCR)	46
3.2.10. Statistische Analyse	48
4. ERGEBNISSE	49
4.1. ETABLIERUNG DER NACHWEISMETHODEN FÜR IA-2	49
4.1.1. Nachweis der IA-2 Expression in INS-1 Zellen und primären Ratten-Inseln	49
4.1.2. Etablierung der kompetitiven RT-PCR	50
4.1.3. Etablierung der real-time RT-PCR (LightCycler RT-PCR).....	51
4.1.4. Vergleich von Northern Blot Analyse, kompetitiver RT-PCR und Real- Time RT-PCR	56
4.2. EINFLUß VON METABOLISCHEN UND HORMONELLEN FAKTOREN AUF DIE EX- PRESSION VON IA-2 UND INSULIN	60
4.2.1. Einfluß von Glucose auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen.....	60

4.2.2. Die cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX stimulieren die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen.....	63
4.2.3. Einfluß der cAMP-stimulierenden Hormone Glucagon und GLP-1 auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen.....	66
4.2.4. Einfluß von Faktoren, die die Insulinsekretion hemmen, auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen.....	70
4.2.5. Glucose und synthetische cAMP-Stimulantien stimulieren die mRNA Expression von IA-2 auch in primären Inseln von Ratten.....	73
4.3. EINFLUß VON ZYTOKINEN AUF DIE EXPRESSION VON IA-2 UND INSULIN.....	75
4.3.1. Proinflammatorische Zytokine inhibieren die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen	75
4.3.1.1. Dosisabhängigkeit der Zytokin-induzierten Inhibition der mRNA Expression von IA-2 und Insulin	75
4.3.1.2. Zeitabhängigkeit des Zytokin-induzierten Effekts auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin	78
4.3.1.3. Die Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA Expression wird durch Stimulation mit Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine potenziert.....	80
4.3.1.4. Proinflammatorische Zytokine inhibieren auch die Insulinsekretion der INS-1 Zell-Linie	81
4.3.2. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Mediator der Zytokin-induzierten Inhibition von IA-2 und Insulin	83
5. DISKUSSION	87
5.1. DIE REGULATION DER GENEXPRESSION VON IA-2 DURCH METABOLISCHE UND HORMONELLE STIMULANTIEN.....	87
5.2. DIE INHIBITION DER MRNA-EXPRESSION VON IA-2 DURCH PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE	94
6. ZUSAMMENFASSUNG	99
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	101
8. ABKÜRZUNGEN.....	115
9. LEBENSLAUF	119
10. PUBLIKATIONEN	120

1. Einleitung

1.1. Der Typ 1 Diabetes

Der Diabetes mellitus ist eine durch chronische Hyperglykämie charakterisierte Krankheit, die durch eine gestörte Sekretion von Insulin und/oder durch eine verminderte Insulinwirkung auf die Zielgewebe verursacht wird. Nach den neuen Diagnosekriterien der American Diabetes Association (ADA), die auch durch die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) bestätigt wurden, ist der Typ 1 Diabetes durch eine allmähliche Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gekennzeichnet, wodurch ein Insulinmangel-Syndrom hervorgerufen wird. Man unterscheidet dabei zwischen dem immun-medierten Typ 1A Diabetes und dem idiopathischen (nicht immun-medierten) Typ 1B Diabetes (ADA, 1997; Scherbaum et al., 2001; Atkinson und Eisenbarth, 2001). Beim Typ 1A Diabetes werden die insulinproduzierenden Betazellen des endokrinen Pankreas von genetisch prädisponierten Personen in einem chronischen Autoimmunprozess zerstört, der durch eine Infiltration der pankreatischen Inseln (Insulitis) mit mononukleären Zellen (CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen) charakterisiert ist (Bach, 1994; Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998). Die Autoimmunantwort ist dabei gegen verschiedene Betazellproteine (Autoantigene) gerichtet. Im Verlaufe dieses Prozesses können ebenfalls Autoantikörper gegen diese Betazellproteine gebildet werden, die man heute als klinische Marker für die Diagnose und Prädiktion eines Typ 1 Diabetes nutzt.

Das gegenwärtige Modell der immun-medierten Entstehung des Typ 1A Diabetes besagt, dass Th1-Lymphozyten, die vor allem die Zytokine Interleukin 2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) sezernieren, für die pathogene Autoimmunantwort verantwortlich sind. Demgegenüber sind Th2-Lymphozyten, die hauptsächlich die Zytokine IL-4 und IL-10 sezernieren, und Th3-Lymphozyten, die "Transforming growth factor beta1" (TGF β ₁) sezernieren, mit einer protektiven Immunantwort assoziiert (Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998). Studien an Tiermodellen des Typ 1 Diabetes ("Non-obese-diabetic" (NOD)-Maus, "Biobreeding" (BB)-Ratte) haben gezeigt, dass die Infiltration der Inseln (Insulitis) und die Entwicklung eines Diabetes mit einem Th1-Zytokinprofil assoziiert waren (Rabinovitch, 1995, 1996; Katz et al., 1995; Heurtier und Boitard, 1997). Die beobachteten protektiven Effekte von IL-4, IL-4-sezernierenden T-Lymphozyten und IL-10 gegen die Entwicklung eines Diabetes im Tiermodell führten zu der Hypothese, dass Th2-Lymphozyten eine destruktive Insulitis vermutlich durch Unterdrückung der IFN- γ -sezernierenden Th1-Lymphozyten verhindern können (Rapoport et al., 1993;

Fowell und Mason, 1993; Pennline et al., 1994). Zusammenfassend wurde aus diesen Studien das Konzept abgeleitet, dass Typ 1 Diabetes im Ergebnis einer Störung der Immunregulation entsteht, die zu einer Dominanz von Th1-Lymphozyten und ihren Zytokinen gegenüber Th2-Lymphozyten und ihren Zytokinen führt (Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998).

1.2. Autoantigene beim Typ 1 Diabetes

Als wichtigste Targetproteine (Autoantigene) der Autoimmunreaktion beim Typ 1 Diabetes werden heute das von den Betazellen produzierte und sezernierte Hormon Insulin, die 65 kD-Isoform des Enzyms Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD65) und die Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 (ICA512) betrachtet. Neben diesen Haupt-Autoantigenen wurden zahlreiche weitere Betazellproteine (z.B. ICA 69, Glim 38, Imogen 38, Sox-13, Hsp 65, Carboxypeptidase H) beschrieben, gegen die ebenfalls eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort gerichtet sein kann, was die komplexe Natur der Autoimmunprozesse bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes verdeutlicht.

Die drei wichtigsten Autoantigene des Typ 1 Diabetes sind vorrangig in Zellen mit neuroendokrinem Ursprung exprimiert und mit dem Sekretionsapparat dieser Zellen assoziiert, während die meisten der anderen diabetes-assoziierten Autoantigene keine derartige zell- und organellspezifische Lokalisation zeigen.

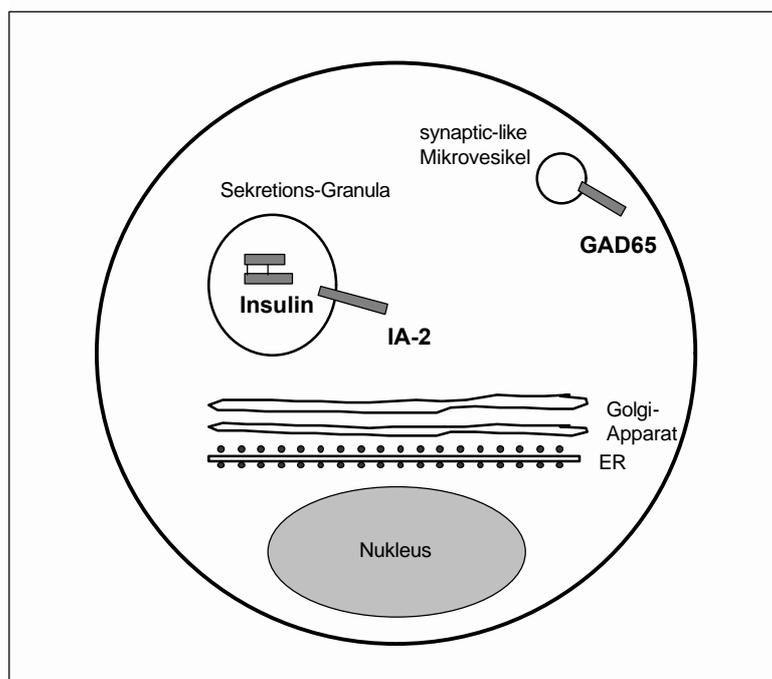


Abb.1: Schematische Darstellung einer Pankreas-Betazelle mit der intrazellulären Verteilung der diabetes-assoziierten Autoantigene IA-2, Insulin und GAD (nach Solimena, 1998)

1.2.1. IA-2

1.2.1.1. Proteinstruktur

Humanes IA-2 (GenBank-Nummer: NM_002846; NP_002837) ist ein aus 979 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein mit einer extrazytoplasmatischen Domäne (Aminosäure 1-575), einer Transmembrandomäne (AS 576-600) und einer intrazytoplasmatischen Domäne (AS 601-979).

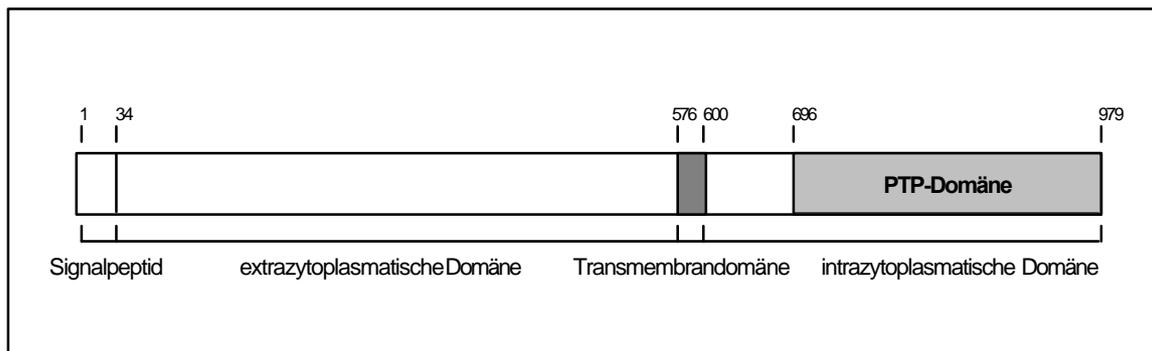


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen IA-2 (nach Hermel et al., 1999)

Die aminoterminal gelegene extrazytoplasmatische Domäne enthält ein Signalpeptid (AS 1-34), eine Cystein-reiche Region und zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asparagin 506 und 524). In der carboxyterminalen intrazytoplasmatischen Domäne besitzt IA-2 eine als PTP-Domäne bezeichnete Region (AS 696-979), die etwa 30% Homologie zu intrazytoplasmatischen Domänen von Proteinen aus der Familie der membranassoziierten Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) aufweist. Innerhalb dieser Proteinfamilie hat die Leukocyte Antigen-related Tyrosinphosphatase LAR (Nam et al., 1999) mit 33% die größte Homologie zu IA-2. Die intrazytoplasmatische Domäne von IA-2 weist außerdem eine Homologie von 72% mit der intrazytoplasmatischen Domäne von IA-2 β (Wasmeier und Hutton, 1996; Lu et al., 1996) auf. IA-2 bildet zusammen mit IA-2 β eine Proteinfamilie innerhalb der PTP-Superfamilie (Cai et al., 2001). Die Sequenz der intrazytoplasmatischen Domäne von IA-2 ist bei Säugetieren hoch konserviert: Die intrazytoplasmatischen Domänen von humanem, bovinem, murinem und Ratten IA-2 sind zu 97% identisch. Das aktive Zentrum der PTP-Domäne von IA-2 (und IA-2 β) unterscheidet sich durch Substitution zweier Aminosäuren von der Konsensus-Sequenz der aktiven Zentren aller anderen bekannten membranassoziierten Protein-Tyrosin-Phosphatasen (VHCSAGXGR S/T G). Die im IA-2 substituierten Aminosäuren (Ala⁹¹¹ \rightarrow Asp und Asp⁸⁷⁷ \rightarrow Ala) sind für die enzymatische Aktivität der PTPs notwendig, was erklärt, warum es bisher nicht gelungen ist, eine Phosphatase-Aktivität von IA-2 mit bekannten PTP-Substraten nachzuweisen (Notkins et al.,

1998). Die enzymatische Aktivität von IA-2 kann rekonstituiert werden, wenn man diese beiden Aminosäure-Austausche durch *in-vitro*-Mutagenese rückgängig macht (Magistrelli et al., 1996).

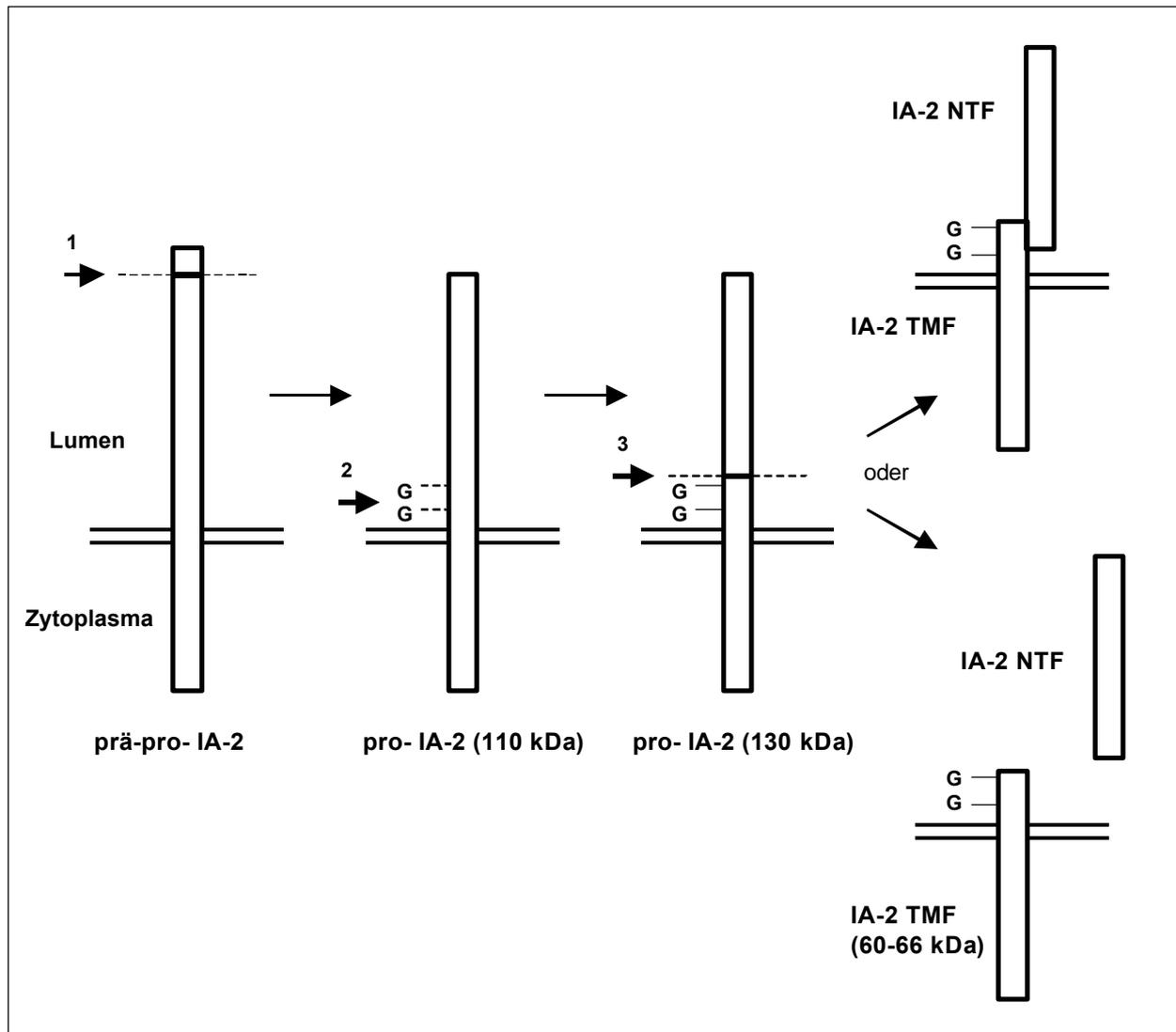


Abb. 3: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikationen des humanen IA-2 (nach Hermel et al., 1999)
 (1: Abspaltung des Signalpeptids, 2: Glykosylierung, 3: Spaltung in IA-2 NTF und IA-2 TMF)

IA-2 ist *in vivo* in mehreren Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachweisbar, die während der posttranslationalen Prozessierung des Proteins gebildet werden (Hermel et al., 1999). Neu synthetisiertes IA-2 liegt nach Abspaltung der Signalsequenz zunächst als Pro-Protein von 110 Kilodalton (kD) Größe vor. Durch Glykosylierung der Asparaginreste 506 und 524 (und möglicherweise Sulfurierung von Tyrosinresten) entsteht daraus ein 130 kD Pro-Protein, das anschließend durch Prohormon-Konvertasen, die in den insulinsekretorischen Granula lokalisiert sind, in ein N-terminales Fragment (IA-2 NTF) und in ein

Transmembranfragment (IA-2 TMF) gespalten wird. In Western Blots von Ratten-Inselzell-Lysaten wird hauptsächlich das IA-2 TMF in Form von multiplen Banden im Molekulargewichtsbereich von 60 bis 65 kD detektiert, die vermutlich unterschiedlich phosphorylierte oder anders posttranslational modifizierte Formen des Proteins repräsentieren (Roberts et al., 2001).

1.2.1.2. Genomische Struktur

Das humane IA-2 Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q35) lokalisiert (Lan et al., 1996). Es hat eine Länge von etwa 20 Kilobasen (kb) und besteht aus 23 Exons und 22 Introns. Exon 1 bis Exon 12 kodieren für das Signalpeptid und den extrazytoplasmatischen Teil, Exon 13 kodiert für die Transmembrandomäne und Exon 13 bis Exon 23 kodieren für den intrazytoplasmatischen Teil (Xie et al., 1998).

Die Promotor-Region des humanen IA-2 enthält keine TATA- oder CAAT- Box. Stattdessen befinden sich in der Nähe des Transkriptionsstarts zwei Sp1 Bindungsstellen, die für die Initiation der Transkription in Genen ohne TATA-Box benötigt werden (Boisclair et al., 1993). Zusätzlich enthält die Promotor-Region mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie GATA-1, AP-1, E2F und YY1 sowie eine Bindungsstelle für das cAMP response element binding Protein CREB (Yamamoto et al., 1988; Seto et al., 1991; Merika und Orkin, 1993).

Die genomische Struktur des murinen IA-2 wurde ebenfalls aufgeklärt, wobei sich ein hoher Grad an Übereinstimmung mit dem humanen IA-2 zeigte: Das Maus-Gen für IA-2, das sich auf Chromosom 1 befindet, enthält ebenfalls 23 Exons und eine Promotor-Region mit möglichen Bindungsstellen für die gleichen Transkriptionsfaktoren wie beim humanen IA-2 (Saeki et al., 2000).

1.2.1.3. Expression

IA-2 ist kein betazell-spezifisches Protein, sondern wird in einer Vielzahl von neuroendokrinen Geweben exprimiert. Eine Expression von IA-2 wurde in peptidergen Neuronen des zentralen Nervensystems, in der Hypophyse, in chromaffinen Zellen der Nebenniere und in pankreatischen Inseln detektiert (Lan et al., 1994). In den neuroendokrinen Zellen ist IA-2 in den Membranen der sekretorischen Granula angereichert, die für die regulierte Sekretion von Neuropeptiden und Peptidhormonen verantwortlich sind (Solimena et al., 1996; Dirx et al., 1998). In den Betazellen des endokrinen Pankreas ist IA-2 in den Membranen der insulinsekretorischen Granula lokalisiert. Dagegen ist es in den synaptic-like Mikrovesikeln, der anderen Art von regulierten sekretorischen Vesikeln in neuroendokrinen Zellen, nicht nachweisbar. IA-2 ist während der Embryonalentwicklung von Ratten nur transient nachweisbar und seine Expression wird erst nach der Geburt in den ersten zehn Lebenstagen parallel mit der Entwicklung einer regulierten stimulus-induzierten Insulinsekretion in Betazellen hochreguliert (Roberts et al., 2001).

In neueren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass IA-2 wie auch andere diabetes-assoziierte Autoantigene (Insulin, GAD) von antigenpräsentierenden Zellen im humanen Thymus und in peripheren lymphoiden Organen wie Milz und Lymphgefäßen in geringen Mengen exprimiert wird (Pugliese et al., 1997, 2001; Sospedra et al., 1998). Im Gegensatz zu den Betazellen des Pankreas, wo das vollständige IA-2 exprimiert wird, wird die IA-2 mRNA im Thymus und in der Milz alternativ gespleißt (Diez et al., 2001). Den alternativ gespleißten IA-2 Transkripten in Thymus und Milz fehlt Exon 13 (und teilweise auch Exon 14). Exon 13 kodiert neben der Transmembrandomäne auch den N-terminalen Teil der intrazytoplasmatischen Domäne von IA-2, auf dem sich ein immundominantes B-Zell-Epitop befindet. Das differentielle Spleißen der IA-2 mRNA in den Betazellen des Pankreas und in lymphoiden Organen könnte daher einen möglichen Mechanismus bei der Entwicklung einer Autoimmunreaktion gegen IA-2 darstellen.

1.2.1.4. Autoantikörper gegen IA-2

Im Jahre 1990 wurden in Seren von Patienten mit Typ 1 Diabetes durch Immunpräzipitation mit radioaktiv markiertem Betazell-Lysat Autoantikörper gegen ein Protein von 64 Kilodalton (kD) Molekulargewicht nachgewiesen, das durch partiellem proteolytischem Verdau mit Trypsin in zwei Fragmente von 37 kD und 40 kD aufgespalten werden konnte. (Christie et al., 1990). Die molekulare Identität dieser beiden Proteinfragmente konnte nach der Klonierung von IA-2 und IA-2 β aufgeklärt werden. IA-2, auch als ICA 512 bezeichnet, wurde von zwei

Arbeitsgruppen unabhängig voneinander kloniert: durch Screening einer Inselzell-cDNA Expressionsbank mit Seren von Typ 1 Diabetikern (Rabin et al., 1992, 1994) sowie durch Identifizierung betazellspezifischer Gene nach Subtraktion einer Glucagonoma cDNA Bank von einer Insulinoma cDNA Bank (Lan et al., 1994). IA-2 β , auch als Phogrin bekannt, wurde durch Expressionsscreening einer Ratten-Insulinoma cDNA Bank (Wasmeier und Hutton, 1996) sowie durch Screening einer Maus-Insulinoma cDNA Bank nach neuen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Lu et al., 1996) kloniert. Proteolytischer Verdau des rekombinanten IA-2 und IA-2 β mit Trypsin sowie kompetitive Inhibitionsstudien identifizierten IA-2 als Präkursor-Molekül des 40 kD-Proteinfragments und IA-2 β als Präkursor-Molekül des 37 kD-Proteinfragments (Payton et al., 1995; Lu et al., 1996).

Seit der Klonierung von IA-2 wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, bei denen rekombinantes radioaktiv markiertes IA-2 für Radioimmunpräzipitations- bzw. Radioliganden-Assays eingesetzt wurde, um Autoantikörper gegen IA-2 in Seren von Typ 1 Diabetikern und deren Verwandten sowie in Seren von Risikopersonen nachzuweisen und den Wert dieser Autoantikörper für Diagnose und Prädiktion des Typ 1 Diabetes zu bestimmen. Diese Studien haben bewiesen, dass Autoantikörper gegen IA-2 hoch spezifische und sensitive serologische Marker für den Typ 1 Diabetes darstellen. IA-2-Autoantikörper (IA-2-A) wurden in der Mehrzahl der Seren von Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes (50-70%) detektiert, während gesunde Kontrollpersonen weniger als 1% IA-2-A haben (Lan et al., 1996; Verge et al., 1996; Morgenthaler et al., 1997). Eine erhöhte Häufigkeit von IA-2-A findet man bei jüngeren Patienten und bei Patienten mit dem HLA-DR4 Allel, das genetisch für eine schnellere und aggressivere Entwicklung eines Typ 1 Diabetes prädisponiert (Genovese et al., 1996; Hawa et al., 1997; Gorus et al., 1997). Durch kombiniertes Screening von Autoantikörpern gegen IA-2 und Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) ist es möglich, 98% der Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes zu identifizieren, womit man die früher übliche, aufwändigere Bestimmung der intrazytoplasmatischen Inselzell-Antikörper (ICA) heute weitgehend durch die Bestimmung der IA-2-A und GAD-A ersetzen kann (Verge et al., 1996; Wiest-Ladenburger et al., 1997). IA-2-A haben ebenfalls prädiktive Bedeutung, da sie ein erhöhtes Risiko für die schnelle Entwicklung eines Typ 1 Diabetes bei prädiabetischen Kindern anzeigen (Verge et al., 1996; Seißler et al., 1996; Kulmala et al., 1998).

Die Autoantikörper in Seren von Patienten mit Typ 1 Diabetes sind nur gegen die intrazytoplasmatische Domäne von IA-2 gerichtet (Zhang et al., 1997). In mehreren Studien wurden Konformationsepitope im N-terminalen, mittleren und C-terminalen Teil der

intrazytoplasmatischen Domäne charakterisiert (Lampasona et al., 1996; Zhang et al., 1997; Seißler et al., 2000), während lineare B-Zell-Epitope nicht definiert werden konnten.

In einer Screening-Studie mit Risikopersonen, die später einen Typ 1 Diabetes entwickelten, wurde gezeigt, dass während der präklinischen Phase nacheinander zusätzliche Epitope auf verschiedenen Domänen von IA-2 erkannt werden ("intramolecular epitop spreading") (Kawasaki et al., 1998).

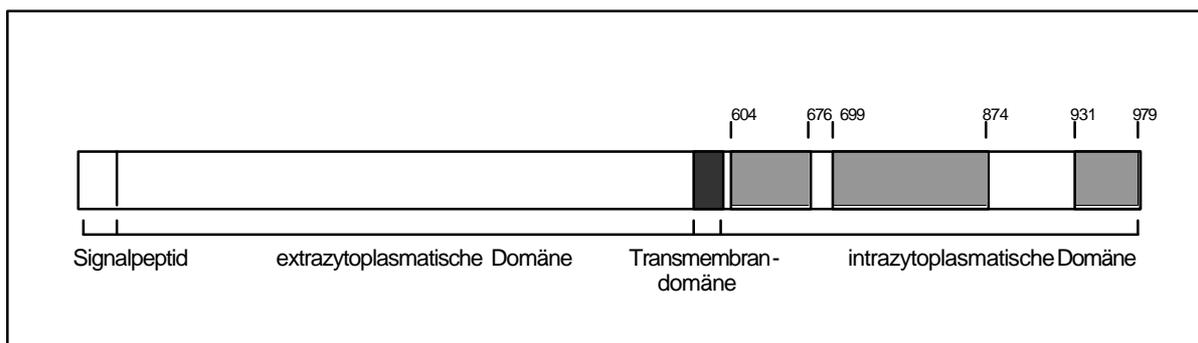


Abb. 4: Immundominante B-Zell-Epitope des humanen IA-2 (nach Seißler et al., 2000)
IA-2-Autoantikörper sind gegen Konformationsepitope im N-terminalen (AS 604-699, mittleren (AS 699-874) und C-terminalen (AS 931-979) Teil der intrazytoplasmatischen Domäne von IA-2 gerichtet.

Bei 35-50% der Patienten mit Typ 1 Diabetes sind ebenfalls Antikörper gegen das mit IA-2 verwandte Protein IA-2 β (Phogrin) nachweisbar (Lu et al., 1996). Durch Blockierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die humorale Immunantwort gegen IA-2 β fast ausschließlich durch kreuzreaktive Antikörper verursacht wird, die Konformationsepitope im carboxyterminalen Teil der intrazytoplasmatischen Domänen von IA-2 und IA-2 β erkennen (Hatfield et al., 1997).

Das Auftreten von Autoantikörpern gegen IA-2 hat wahrscheinlich keine direkte pathologische Bedeutung, sondern reflektiert die Zerstörung der pankreatischen Betazellen im Verlaufe der Entstehung eines Typ 1 Diabetes, wodurch die intrazytoplasmatische Domäne von IA-2 erst für eine Autoimmunantwort zugänglich wird.

1.2.1.5. T-Zellreaktivität gegen IA-2

Während Autoantikörper gegen IA-2 durch viele Studien gut charakterisiert sind, ist über die zelluläre Immunantwort gegen IA-2 zur Zeit noch nicht viel bekannt. Da die T-Zellen, die die Inseln des Pankreas während der Entstehung eines Typ 1 Diabetes infiltrieren, beim Menschen nicht zugänglich sind, wurde in einer Reihe von Studien untersucht, ob T-Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) gegen rekombinantes IA-2 bzw. synthetische IA-2-Peptide proliferieren können. Dabei wurde die Präsenz von IA-2-reaktiven T-Zellen im peripheren Blut demonstriert, die sowohl gegen das vollständige IA-2 (Dotta et al., 1999) als auch gegen den intrazytoplasmatischen Teil von IA-2 (Ellis et al., 1998) eine Immunantwort zeigten. Die Häufigkeit und der Stimulationsindex der PBMC-Proliferation gegen IA-2 sind bei Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes und bei Personen mit hohem Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes signifikant größer als bei gesunden Kontrollpersonen (Durinovic-Bellò et al., 1996; Ellis et al., 1998). Die IA-2-stimulierte Proliferation von T-Zellen aus dem peripheren Blut und das Auftreten von Autoantikörpern gegen IA-2 sind nicht miteinander assoziiert (Ellis et al., 1998).

Durch Generierung von T-Zell-Linien nach Stimulation von PBMCs aus Patienten mit Typ 1 Diabetes mit rekombinatem IA-2 und Testen der Reaktivität dieser Zell-Linien gegen synthetische IA-2 Peptide konnten zwei potentielle T-Zell-Epitope von IA-2 identifiziert werden (Hawkes et al., 2000). Diese beiden Epitope repräsentieren die Aminosäuren 751-770 sowie 831-850 von IA-2, die beide in der mittleren Domäne der intrazytoplasmatischen Region von humanem IA-2 liegen, in der sich ebenfalls ein B-Zell-Konformationsepitop befindet. Eine T-Zell-Antwort gegen IA-2 wurde ebenfalls in der Non-Obese-Diabetes-Maus (NOD-Maus), einem Tiermodell des humanen Typ 1 Diabetes, detektiert (Trembleau et al., 2000). IA-2 spezifische CD4⁺-Zellen sind nach Injektion von rekombinatem IA-2 in mesenteralen und pankreatischen Lymphgefäßen sowie in der Milz von drei Wochen alten NOD-Mäusen nachweisbar.

Aus den bisher vorliegenden Studien lässt sich schlussfolgern, dass die spezifische T-Zell-Antwort gegen IA-2 ein frühes Ereignis bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes sowohl beim Menschen als auch bei der NOD-Maus darstellt.

1.2.2. Insulin

Insulin, eines der Haupt-Hormone des endokrinen Pankreas, wird nur in den Betazellen des Pankreas und (in sehr geringem Umfang) im Thymus exprimiert. Die genomische DNA der meisten Wirbeltier-Spezies enthält ein Insulin-Gen, das beim Menschen auf dem Chromosom 11 lokalisiert ist (Owerbach et al., 1980; Steiner et al., 1985). Ratte und Maus besitzen dagegen zwei Insulin-Gene (Insulin I und II), die über 90% Homologie aufweisen und etwa gleich stark exprimiert werden (Soares et al., 1985; Wentworth et al., 1986). Insulin wird als ein Präpro-Hormon synthetisiert, aus dem zunächst durch Abspaltung der Signalsequenz im endoplasmatischen Retikulum das Pro-Insulin und danach durch Abspaltung des C-Peptids in den Sekretionsgranula das Insulin entsteht. Nach der posttranslationalen Prozessierung besteht Insulin aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 Aminosäuren und der B-Kette mit 30 Aminosäuren, die durch zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. In der A-Kette enthält Insulin eine dritte Disulfidbrücke, die zur Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt. Insulin wird als Zink-Komplex in den Insulin-Sekretionsgranula der Betazellen gespeichert und nach Stimulation (z.B. durch Erhöhung der Glucosekonzentration) durch regulierte Exozytose sezerniert (Löffler und Petrides, 1998).

Autoantikörper gegen Insulin (IAA) können mit Radioliganden-Assays, die ¹²⁵Jod-markiertes Insulin verwenden, in 40-80% der Seren von Kindern mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden (Verge et al., 1998). Der IAA-Titer ist invers korreliert mit dem Alter der Patienten (Vardi et al., 1988). IAA gehören zu den ersten Autoantikörpern, die während der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes nachweisbar sind und besitzen damit auch einen prädiktiven Wert (Yu et al., 2000). In der NOD-Maus, einem Tiermodell des Typ 1 Diabetes, sind IAA ebenfalls sehr früh (im Alter von 8 Wochen) nachweisbar und mit der schnellen Entwicklung eines Diabetes korreliert (Yu et al., 2000).

Eine T-Zellantwort gegen Insulin wurde sowohl bei Patienten mit Typ 1 Diabetes und Personen mit hohem Risiko für einen Typ 1 Diabetes (Durinovic-Bellò, 1996) als auch bei der NOD-Maus nachgewiesen (Wegmann et al., 1994). Die bisher identifizierten Epitope, die von diabetogenen CD4⁺ - und CD8⁺ -T-Zellklonen der NOD-Maus erkannt werden, liegen in derselben Region des Insulin-Moleküls: Aminosäure 9-23 der Insulin B-Kette bei CD4⁺ - T-Zellen (Daniel et al., 1995) bzw. Aminosäure 15-23 der Insulin B-Kette bei CD8⁺ - T-Zellen (Wong et al., 1999).

1.2.3. Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD)

Das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) ist im zentralen und peripheren Nervensystem, im Ovar, den Hoden sowie in den Betazellen des Pankreas exprimiert. Es existieren zwei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (GAD65 und GAD67), die von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden und in ihrer Aminosäuresequenz 65% Homologie aufweisen (Bu et al., 1992). Beide Isoformen enthalten eine Bindungsstelle für Pyridoxalphosphat (PLP), den für die enzymatische Aktivität benötigten Kofaktor (Ellis und Atkinson, 1996). GAD katalysiert die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) aus Glutaminsäure. Die biologische Funktion von GAD im Pankreas ist noch unklar. Es wird angenommen, dass GABA eine Rolle als parakrines Signalmolekül in den Inseln des Pankreas spielen könnte, da sowohl in Alpha- als auch in Deltazellen der Inseln GABA-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Michalik und Erecinska, 1992). Die in humanen Inseln dominierende Isoform GAD65 ist in Betazellen hauptsächlich in der Membran der synaptic-like Mikrovesikel (SLMV) lokalisiert, während GAD67 vor allem im Zytoplasma nachweisbar ist (Bu et al., 1992).

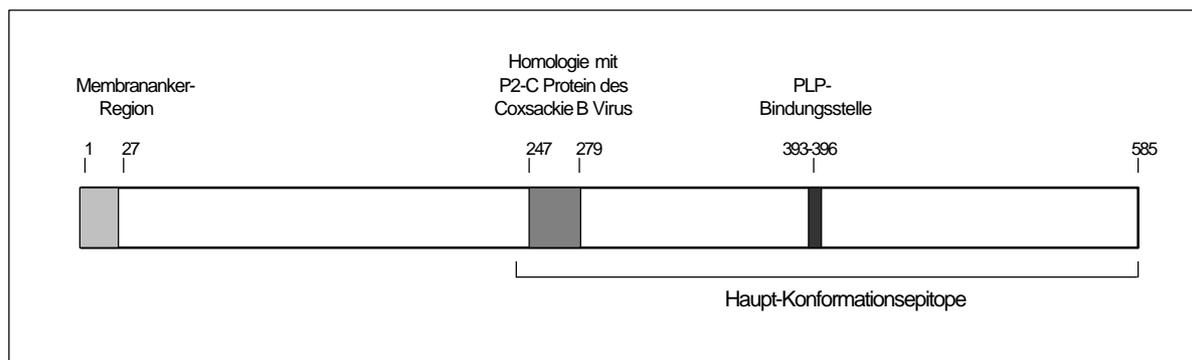


Abb. 5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des humanen GAD65 (nach Leslie et al., 1999)

Die Isoform GAD65 wurde als Targetmolekül von Autoantikörpern aus dem Serum von Kindern mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes identifiziert, die ein Inselzellprotein von 64 Kilodalton (kD) Molekulargewicht immunpräzipitieren konnten (Baekkeskov et al., 1982; 1990). Autoantikörper gegen GAD65 können im Serum von 50-80% der Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes, aber weniger als 2% der gesunden Kontrollpersonen, nachgewiesen werden (Velloso et al., 1993). Anders als Autoantikörper gegen Insulin oder IA-2 finden sich Autoantikörper gegen GAD häufig auch noch Jahre nach der Diagnose eines Typ 1 Diabetes im Serum der Patienten (Atkinson et al., 1993). Autoantikörper gegen GAD wurden ebenfalls in Seren von Patienten mit latentem autoimmunem Diabetes bei Erwachsenen (LADA) nachgewiesen, die früher klinisch als Typ 2 Diabetiker charakterisiert

wurden (Seißler et al., 1998). GAD65 ist außerdem das Targetprotein für Autoantikörper in einer weiteren Autoimmunerkrankung, dem Stiff-Man-Syndrom (Butler et al., 1993). Die Autoantikörper in Seren von Typ 1 Diabetes Patienten reagieren vor allem mit Konformationsepitopen in der mittleren (AS 245-449) und in der carboxyterminalen (AS 450-585) Region von GAD65 (Richter et al., 1993). Zusätzlich zu Autoantikörpern gegen GAD65 findet man bei 10-20% der Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes ebenfalls Autoantikörper gegen GAD67. GAD67 stellt aber wahrscheinlich kein unabhängiges Target-Autoantigen dar, sondern wird von kreuzreaktiven GAD65-Autoantikörpern erkannt (Hagopian et al., 1993; Velloso et al., 1993).

Die zelluläre Immunantwort gegen GAD ist weniger gut charakterisiert als die humorale Immunantwort. T-Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) von Typ 1 Diabetikern und Personen mit hohem Risiko für einen Typ 1 Diabetes können mit GAD und GAD-Peptiden proliferieren (Atkinson et al., 1992), wobei die zelluläre und die humorale Immunantwort invers korreliert sind (Harrison et al., 1993). GAD65 enthält ein Sequenzmotiv (AS 247-279) mit hoher Sequenzhomologie zum P2-C Protein des Coxsackie B Virus. PBMCs von Patienten mit Typ 1 Diabetes, die mit dem GAD-Peptid aus den Aminosäuren 247-279 reagieren, proliferieren ebenfalls bei Stimulation mit dem homologen viralen Peptid (Atkinson et al., 1994). Dies führte zu der Hypothese, dass die Autoimmunreaktion gegen GAD auch durch eine vorherige Immunantwort gegen das Coxsackie-Virusprotein induziert werden könnte ("molecular mimicry").

1.2.4. Andere diabetes-assoziierte Autoantigene

Neben den drei Haupt-Autoantigenen des Typ 1 Diabetes wurden mehrere andere Betazellproteine ebenfalls als mögliche Targets der humoralen und/oder zellulären Autoimmunantwort beim Typ 1 Diabetes beschrieben. Sie sind aber weniger gut charakterisiert als IA-2, Insulin und GAD. Autoantikörper gegen diese zusätzlichen Autoantigene weisen nach heutigem Kenntnisstand eine deutlich niedrigere Sensitivität und Spezifität auf als Autoantikörper gegen die drei Haupt-Autoantigene und spielen daher für Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes derzeit keine Rolle.

Autoantigen	Charakterisierung des Autoantigens
Carboxy-peptidase H	Enzym in den insulinsezernierenden Granula der Betazellen Identifizierung durch Screening einer Inselzell-Expressionsbank mit Seren von Typ 1 Diabetikern (Castano et al., 1991) keine erhöhte Häufigkeit der Antikörper bei Typ 1 Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen im Radioligandassay (Bonifacio et al., 1995)
Glima 38	N-glykosyliertes neuroendokrines Membranprotein Sequenz bisher unbekannt Antikörper gegen Glima 38 bei 20% der Typ 1 Diabetiker durch Immunpräzipitation detektiert (Aanstoot et al., 1996; Roll et al., 2000)
Heatshockprotein 65 (Hsp 65)	ubiquitär exprimiertes Stressprotein mit Sequenzhomologie zu GAD65 Antikörper gegen Hsp 65 bei 16% der Typ 1 Diabetiker (mit niedrigem Titer) und bei 20% der Patienten mit rheumatoider Arthritis durch ELISA detektiert (Tun et al., 1994; Ozawa et al., 1996)
ICA 69	neuroendokrines zytoplasmatisches Protein mit Sequenzhomologie zu bovinem Serumalbumin Antikörper gegen ICA 69 bei 20-30% der Typ 1 Diabetiker und bei 30% der Patienten mit rheumatoider Arthritis durch Western Blotting detektiert (Pietropaolo et al., 1993; Martin et al., 1995) zelluläre Immunantwort gegen ICA 69 bei Patienten mit neu diagnostiziertem Typ 1 Diabetes (Roep et al., 1996)
Imogen 38	ubiquitär exprimiertes mitochondriales Protein Identifizierung durch Screening einer Antigen-Epitop-Bank mit einem humanen T-Zellklon eines Typ 1 Diabetikers (Arden et al., 1996)
Sox-13	Transkriptionsfaktor, ubiquitär exprimiertes zytoplasmatisches Protein Identifizierung durch Screening einer Inselzell-Expressionsbank mit Seren von Typ 1 Diabetikern (Rabin et al., 1992) Antikörper gegen Sox-13 bei je 11% der Typ 1 Diabetiker und der Patienten mit Sklerodermie durch Radioligandassay detektiert (Steinbrenner et al., 2000)

Tab.1: Andere diabetes-assoziierte Autoantigene

1.3. Die Rolle von proinflammatorischen Zytokinen bei der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes

Während des autoimmunen Prozesses, der zur Zerstörung der Betazellen des endokrinen Pankreas führt, werden von aktivierten Makrophagen und T-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen sezerniert. Eine destruktive Insulitis und nachfolgende Entwicklung eines Typ 1 Diabetes ist mit der Produktion und Sekretion von Th1-spezifischen Zytokinen (IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF- β) sowie proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) assoziiert, Proinflammatorische Zytokine, deren Präsenz in infiltrierten Inseln von NOD-Mäusen auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen wurde (Held et al., 1990; Rabinovitch et al., 1996), haben *in vitro* zytostatische und zytotoxische Effekte auf humane und murine Betazellen, die durch Kombinationen der Zytokine potenziert werden (Mandrup-Poulsen, 1996; Rabinovitch et al., 1998). Eine mögliche Beteiligung dieser Zytokine an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes wurde erstmals durch den Nachweis von strukturellen und funktionellen Schäden, die Zytokin-Präparationen aus Zellüberständen von aktivierten Makrophagen *in vitro* an murinen Inseln verursachten, demonstriert (Mandrup-Poulsen et al., 1985). Studien mit NOD-Mäusen haben ebenfalls Hinweise darauf ergeben, dass die proinflammatorischen Zytokine *in vivo* an der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes beteiligt sind.

1.3.1. Interleukin-1 beta (IL-1b)

Humanes IL-1 β ist ein aus 153 Aminosäuren bestehendes Protein von 17,3 kD Molekulargewicht, das durch Abspaltung eines N-terminalen Fragments (116 Aminosäuren) aus seinem Präkursor-Protein gebildet wird (Auron et al., 1984). Es wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen produziert. Zusätzlich zum löslichen IL-1 β exprimieren diese Zellen auch eine membranassoziierte Form des Proteins mit einem Molekulargewicht von 23 kD (Kurt-Jones et al., 1985). Humanes IL-1 β und das in der vorliegenden Arbeit für Stimulationsversuche verwendete, ebenfalls 17,3 kD schwere rekombinante Ratten-IL-1 β sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 77,1% homolog.

IL-1 β ist an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt, indem es die Synthese des für die Entwicklung eines Th1-Phänotyps charakteristischen Zytokins IL-2 induziert (Gillis und Mizel, 1981). IL-1 β hat *in vitro* allein und in Kombination mit TNF- α und/oder IFN- γ direkte inhibitorische und zytotoxische Effekte auf Betazellen: Es inhibiert die Glucoseoxidation sowie die Glucose-induzierte Insulinsekretion (Mandrup-Poulsen et al., 1986), induziert DNA-Schäden (Delaney et al., 1993), reduziert den intrazellulären cAMP-Gehalt (Sjöholm, 1992) und verändert das Expressionsprofil einer Reihe von Betazellproteinen (Andersen et al.,

1995). Der hauptsächliche Mediator für die durch IL-1 β induzierten Funktionsstörungen der Betazellen scheint Stickstoffmonoxid (NO) zu sein, dessen Produktion IL-1 β durch Induktion des Enzyms induzierbare NO-Synthase (iNOS) stimuliert (Southern et al., 1990). Neben der iNOS-Induktion in Betazellen kann IL-1 β auch die Freisetzung von NO aus Makrophagen stimulieren.

Im Vergleich zu den durch zahlreiche Studien gut charakterisierten *in vitro*-Effekten von IL-1 β auf Betazellen gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die die Beteiligung von IL-1 β an der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes *in vivo* untersuchen: Die Behandlung von NOD-Mäusen mit dem iNOS-Inhibitor Aminoguanidin verzögerte die Entstehung eines Typ 1 Diabetes, konnte aber die Krankheit nicht verhindern (Corbett et al., 1993). Transgene iNOS-defiziente NOD-Mäuse entwickeln ebenfalls noch einen Typ 1 Diabetes. Eine transiente Expression des Gens für den IL-1 Rezeptor-Antagonist (IRAP) in Inseln von prädiabetischen NOD-Mäusen konnte die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes ebenfalls nicht verhindern (Saldeen et al., 2000). Dagegen verhinderte die Behandlung mit einem IL-1 β -Antikörper die Entwicklung eines Cyclophosphamid-induzierten Typ 1 Diabetes in NOD-Mäusen (Cailleau et al., 1997).

1.3.2. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Humanes TNF- α ist ein nichtglykosyliertes, aus 157 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 17,3 kD, das durch Abspaltung einer Signalsequenz von 76 Aminosäuren aus seinem Präkursor-Protein entsteht (Pennica et al., 1984). Es wird von Th1-Lymphocyten, Makrophagen, NK-, Mast- sowie Endothelzellen gebildet. Humanes TNF- α und das in der vorliegenden Arbeit für Stimulationsversuche verwendete, 17,2 kD schwere rekombinante Ratten-TNF- α sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 77,7% homolog.

TNF- α wurde nach seiner Fähigkeit benannt, in Tumoren *in vivo* Nekrose auszulösen und hat *in vitro* zytostatische und zytotoxische Effekte auf Tumorzellen (Carswell et al., 1975). Daneben wurden eine Reihe von Wirkungen auf seine Zielzellen beschrieben, die auch bei der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes von Bedeutung sein könnten: Es reguliert auf Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. E-Selectin, ICAM1 und VCAM1 hoch (Campbell et al., 1989), induziert die Expression von MHC Klasse I und II Molekülen auf Inselzellen (Campbell et al., 1988) und aktiviert antigenpräsentierende Zellen (APCs) und T-Zellen. TNF- α hemmt die Glucose-stimulierte Insulinsekretion von Betazellen (Campbell et al., 1988), kann in Betazellen Apoptose induzieren (Stephens et al., 1999) und

verstärkt in Kombination mit IL-1 β oder IFN- γ die durch Stickstoffmonoxid vermittelte Betazellschädigung (Cetkovic-Crvlje und Eizirik, 1994).

Studien zur transgenen Überexpression von TNF- α sowie subkutane Injektionen von rekombinantem TNF- α in NOD-Mäusen zeigten, dass der Zeitpunkt der Expression bzw. Injektion von TNF- α entscheidend dafür ist, ob die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes beschleunigt oder verhindert wird. Transgene Überexpression von TNF- α in Betazellen von neonatalen NOD-Mäusen hatte die schnelle Entwicklung eines Typ 1 Diabetes bei allen Tieren zur Folge, was vermutlich durch eine verstärkte Präsentation von Betazellantigenen durch APCs verursacht wurde (Green et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde bei transgener Überexpression von TNF- α in Betazellen von adulten NOD-Mäusen zwar eine schnelle Infiltration der Inseln mit Makrophagen und T-Zellen, aber kein Verlust der Betazellen und kein Typ 1 Diabetes beobachtet (Grewal et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Injektion von rekombinantem TNF- α erhalten, die bei bis zu vier Wochen alten NOD-Mäusen die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes beschleunigte, während bei NOD-Mäusen, die zum Zeitpunkt der Injektionen älter als vier Wochen waren, die Diabetesentwicklung verhindert wurde (Yang et al., 1994). NOD-Mäuse, in denen der Rezeptor für TNF- α gentechnisch ausgeschaltet wurde, entwickelten ebenfalls zwar eine Insulinitis, aber keinen Diabetes (Kagi et al., 1999).

1.3.3. Interferon-gamma (IFN-g)

Humanes IFN- γ besteht aus 146 Aminosäuren und liegt in zwei gleichermaßen biologisch aktiven Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (20 kD und 25 kD) vor, die durch eine unterschiedliche posttranslationale Glykosylierung des primären 17,1 kD-Proteins gebildet werden (Rinderknecht et al., 1984). Es wird von Th0-, Th1-, NK- und CTL-Lymphozyten produziert. Seine Produktion wird durch andere Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-12 und IL-18, die von aktivierten Makrophagen sezerniert werden, stimuliert. Humanes IFN- γ und das in der vorliegenden Arbeit für Stimulationsversuche verwendete, 15,9 kD schwere rekombinante Ratten-IFN- γ sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 39,0% homolog.

IFN- γ wurde ursprünglich durch seine antivirale und Anti-Tumor-Wirkung charakterisiert, hat aber daneben vielfältige immunmodulatorische Funktionen, die auch seine Beteiligung an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes nahe legen: Es erhöht die Expression von MHC Klasse I und II-Molekülen in Zellen des Immunsystems und Inselzellen (Campbell et al., 1988) und ist an der Entwicklung des für die destruktive Insulinitis typischen Th1-Phänotyps beteiligt,

während es eine antagonistische Wirkung auf die IL-4- und IL-10-produzierenden Th2-Zellen hat. Durch *in vitro* Experimente konnte demonstriert werden, dass IFN- γ allein oder in Kombination mit TNF- α und IL-1 β auch direkte zytotoxische Effekte auf pankreatische Betazellen hat. Es hemmt die Glucose-induzierte Insulinsekretion in primären murinen Inseln (Campbell et al., 1988) und kann in Ratten-Inseln Zelltod durch Nekrose und Apoptose induzieren (Saldeen, 2000).

Wenn IFN- γ unter Kontrolle des Insulin-Promotors transgen in Betazellen exprimiert wird, entwickeln Mäuse einen Typ 1 Diabetes, der durch verstärkte Expression von MHC- und kostimulierenden Molekülen sowie Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen, aber nicht durch direkte zytotoxische Wirkungen des IFN- γ auf die Betazellen verursacht wird (Sarvetnick et al., 1990). Die Behandlung von NOD-Mäusen mit monoklonalen Antikörpern gegen IFN- γ oder löslichem IFN- γ -Rezeptor, um das IFN- γ zu neutralisieren, verringerte sowohl Insulitis- als auch Diabetesinzidenz im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Debray-Sachs et al., 1991; Nicoletti et al., 1996). Bei transgenen, IFN- γ -Rezeptor-defizienten NOD-Mäusen war ebenfalls eine stark verminderte Insulitis und eine völlige Verhinderung der Diabetesentwicklung zu beobachten (Wang et al., 1997), während im Gegensatz dazu bei transgenen, IFN- γ -defizienten NOD-Mäusen die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes nur verzögert und verringert war (Hultgren et al., 1996).

2. Fragestellung

Die Protein-Tyrosin-phosphatase IA-2 wurde 1994 als ein Haupt-Autoantigen beim Typ 1 Diabetes beschrieben (Lan et al., 1994; Rabin et al., 1994). Während seitdem in einer Vielzahl von Studien die Immunantwort gegen IA-2 im Verlauf der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes charakterisiert wurde, ist die biologische Rolle von IA-2 in der Funktion der Betazellen des endokrinen Pankreas sowie die Regulation der Expression von IA-2 immer noch weitgehend unbekannt. Die fast ausschließliche Lokalisation von IA-2 in den Membranen von sekretorischen Granula verschiedener neuroendokriner Zellen hat schon frühzeitig zu der Hypothese geführt, dass IA-2 in die Reifung und/oder den Transport der Sekretionsgranula bzw. die regulierte Sekretion der in den Granula gespeicherten Peptide involviert sein könnte. Diese Hypothese wird durch zwei neuere Studien unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass IA-2 die Insulin-Sekretionsgranula durch Bindung seiner intrazytoplasmatischen Domäne an das Adapterprotein β 2-Syntrophin mit dem Aktin-Zytoskelett der Betazellen verbindet (Ort et al., 2000) und dass die Expression von IA-2 in Betazellen von neugeborenen Ratten in den ersten Lebensstagen parallel mit der Entwicklung einer Glucose-stimulierten Insulinsekretion hochreguliert wird (Roberts et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von metabolischen und hormonellen Faktoren, die die Proliferation von Betazellen und die Sekretion von Insulin beeinflussen, sowie von inflammatorischen Faktoren (Zytokinen), die im Rahmen der Autoimmunreaktion durch lokale in die Langerhans'schen Inseln des Pankreas infiltrierende Makrophagen und Lymphozyten sezerniert werden, auf die Genexpression von IA-2 untersucht werden. Ziel war es, die Faktoren zu identifizieren, die die Expression von IA-2 in Betazellen des endokrinen Pankreas modulieren und somit an der Induktion einer Autoimmunantwort beteiligt sein könnten. Parallel dazu wurde der Einfluss der verwendeten Stimulanzien auf die Genexpression und die Sekretion von Insulin untersucht und mit den Daten zur Regulation der IA-2 Expression verglichen. Die Untersuchungen wurden an der partiell Glucose-sensitiven Ratten-Insulinoma Zell-Linie INS-1, die ein gutes Modell für Studien der Betazell-Funktion darstellt, und an primären Langerhans'schen Inselzellen der Ratte durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei neuartige PCR-Techniken (kompetitive RT-PCR und LightCycler RT-PCR) etabliert werden, um Veränderungen in der Genexpression von IA-2 und Insulin möglichst sensitiv und zuverlässig zu detektieren.

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der Rolle von IA-2 im Metabolismus der Betazellen, vor allem bei der Regulation der stimulus-induzierten Sekretion von Insulin, sowie bei der Destruktion der Betazellen während der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Betazell-Linie und Versuchstiere

3.1.1.1. Betazell-Linie

Als Modell für die Stimulationsexperimente wurde die INS-1 Ratten-Insulinoma Zell-Linie verwendet, die an der Division de Biochimie Clinique (Genf, Schweiz) aus einem transplantierten, Röntgenstrahlen-induzierten Tumor entwickelt wurde (Asfari et al., 1992) und unserer Arbeitsgruppe von Dr. C.B. Wollheim zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen wurden zwischen Passage 90 und 100 verwendet.

Bei der INS-1 Zell-Linie handelt es sich um eine stabile, hoch differenzierte Betazell-Linie, die partiell sensitiv für Glucose und andere Stimulantien der Insulinsekretion ist, und ähnliche morphologische Charakteristika zeigt wie native Betazellen. Sie stellt daher ein gutes Modell dar, um *in vitro* verschiedene Aspekte der Funktion von Betazellen zu untersuchen.

3.1.1.2. Versuchstiere

Es wurden weibliche, 5-7 Tage alte Wistar-Ratten verwendet, die von der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf bezogen wurden. Die Ratten wurden vor Entnahme des Pankreas eine Nacht nüchtern gehalten und durch eine Überdosis Nembutal getötet.

3.1.2. Reagenzien

Substanz:	Lieferant:
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Anti-Digoxigenin-Antikörper (konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
ATP: Adenosin-5'-triphosphat	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Blockierungsreagenz	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA: bovines Serumalbumin	Promega (Mannheim)
Chloroform	Sigma (Taufkirchen)
CSPD: Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-[5'-chloro]tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
DNA-Molekulargewichtsmarker	
100bp DNA Ladder	Promega (Mannheim)
1kb DNA Ladder	Promega (Mannheim)
DEPC: Diethylpyrocarbonat	Sigma (Taufkirchen)
DIG Easy Hyb Granules	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	Roth (Karlsruhe)
DMSO: Dimethylsulfoxid	Sigma (Taufkirchen)
DTT: Dithiothreitol	Life Technologies (Karlsruhe)
EDTA: Dinatriumethylendiamintetraacetat-dihydrat	Sigma (Taufkirchen)
Enzyme:	
Alkalische Phosphatase	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Promega (Mannheim)
Expand Reverse Transkriptase	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Restriktionsenzyme: Apa I, Ava I, EcoR I, Hinc II, Hind III, Not I, Pst I, Spe I, Xba I	Promega (Mannheim)
Superscript Reverse Transkriptase	Life Technologies (Karlsruhe)
T4 DNA-Ligase	Promega (Mannheim)
T4 Polynukleotid-Kinase	Promega (Mannheim)
Essigsäure (100%)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ficoll PM 400	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
FKS: fötales Kälberserum	Seromed (Berlin)
Formaldehyd (37%)	Sigma (Taufkirchen)
Formamid (deionisiert)	Sigma (Taufkirchen)
Forskolin	Sigma (Taufkirchen)

Gel loading solution	Sigma (Taufkirchen)
GLP-1: Glucagon-like Peptid 1 (7-36) amid (human)	Bachem (Heidelberg)
Glucagon (1-29) (human,bovine, porcine)	Bachem (Heidelberg)
D-Glucose	Life Technologies (Karlsruhe)
L-Glutamin	Life Technologies (Karlsruhe)
Glycerol	Sigma (Taufkirchen)
Hefeextrakt	Life Technologies (Karlsruhe)
IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma (Taufkirchen)
IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactosid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kits:	
BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Kit	Promega (Mannheim)
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Erase-a-Base System	Promega (Mannheim)
Expand High Fidelity PCR System	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
NucleoTrap Gel Extraction Kit	Clontech (Heidelberg)
Rat Insulin RIA Kit	LINCO (St. Louis, MO)
Kollagenase	Sigma (Taufkirchen)
LB Agar	Life Technologies (Karlsruhe)
LB Broth Base	Life Technologies (Karlsruhe)
Lithiumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Maleinsäure	Sigma (Taufkirchen)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
MOPS: 3'-[N-Morpholino]propansulfonsäure	Sigma (Taufkirchen)
N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumacetat	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumnitrit	Sigma (Taufkirchen)
Natronlauge (5 mol/l)	Merck (Darmstadt)
Neutralrot	Merck (Darmstadt)
L-NMMA: N ^G -monomethyl-L-arginin-monoacetat	Alexis (Grünberg)
PCR Nucleotide Mix (dNTP-Mix)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies (Karlsruhe)

PGE ₂ : Prostaglandin E ₂	Sigma (Taufkirchen)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (Taufkirchen)
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
POP6-Polymer	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Primer für cDNA-Synthese p(dT) ₁₅	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Primer für PCR (außer LightCycler RT-PCR)	Biotez (Berlin)
Primer für PCR (LightCycler RT-PCR)	TIB Molbiol (Berlin)
Rp-cAMPS: Adenosin 3',5'-cyclic monophosphothioat, Rp-Isomer. triethylammonium	Alexis (Grünberg)
RPMI 1640 Medium	Life Technologies (Karlsruhe)
Salzsäure (5 mol/l)	Merck (Darmstadt)
SDS: Natriumdodecylsulfat	Sigma (Taufkirchen)
SNAP: S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin	Alexis (Grünberg)
Somatostatin	Sigma (Taufkirchen)
Sulfanilamid	Sigma (Taufkirchen)
Trinatriumcitrat-dihydrat	Sigma (Taufkirchen)
Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma (Taufkirchen)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)
Tween 20: Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Sigma (Taufkirchen)
Wasser (deionisiert; für die Chromatographie)	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (37%)	Merck (Darmstadt)
X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid	Roth (Karlsruhe)
Zytokine:	
IFN _γ : Interferon-gamma	BioSource (Nivelles, Belgien)
IL-1β: Interleukin-1beta	BioSource (Nivelles, Belgien)
IL-2: Interleukin-2	BioSource (Nivelles, Belgien)
IL-4: Interleukin-4	BioSource (Nivelles, Belgien)
TNFα: Tumornekrosefaktor-alpha	BioSource (Nivelles, Belgien)

3.1.3. Medien

LB-Medium	1 % Trypton 0.5 % Hefeextrakt 85.5 mM Natriumchlorid 1 mM Natronlauge
RPMI-Medium I (Basal-Medium)	RPMI 1640 Medium (ohne D-Glukose, ohne L-Glutamin) 0.3 g/l L-Glutamin 1.25 g/l D-Glucose 10 % fötales Kälberserum 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 50 µM Mercaptoethanol
RPMI-Medium II	RPMI 1640 Medium (mit 2 g/l D-Glukose und 0.3 g/l L-Glutamin) 10 % fötales Kälberserum 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 50 µM Mercaptoethanol
SOC-Medium	2 % Trypton 0.5 % Hefeextrakt 10 mM Natriumchlorid 2.5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM D-Glucose

3.1.4. Puffer und Stammlösungen

Assay-Puffer (Rat Insulin RIA Kit)	0.05 M Phosphosaline (pH 7.4) 0.025 M EDTA 0.1 % Natriumazid 1 % BSA
Bindepuffer (High Pure Plasmid Isolation Kit)	4 M Guanidiniumchlorid 0.5 M Kaliumacetat (pH 4.2)
Bindungspuffer (High Pure PCR Product Purification Kit)	3 M Guanidiniumthiocyanat 10 mM Tris-HCl (pH 6.6) 5 % Ethanol
Elutionspuffer (High Pure PCR Product Purification Kit)	1 mM Tris-HCl (pH 8.5)
Ficoll-Stammlösung	20,52 g Ficoll PM 400 69,48 ml Hanks-Stammlösung
Ficoll I-Lösung	17,58 ml Ficoll-Stammlösung 1,42 ml Hanks-Stammlösung
Ficoll II-Lösung	16,53 ml Ficoll-Stammlösung 2,47 ml Hanks-Stammlösung
Ficoll III-Lösung	8,84 ml Ficoll-Stammlösung 10,16 ml Hanks-Stammlösung
Gel-Ladepuffer (für DNA-Agarosegele)	40 % Saccharose 0,1 M EDTA (pH 8,0) 0,5 % SDS 0,05 % Bromphenolblau
Hanks-Arbeitslösung	100 ml Hanks-Stammlösung 10 ml Calciumchloridlösung (1,4%) 1,75 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (7%) 1 g D-Glucose 900 ml Aqua dest.

Hanks-Stammlösung	<i>10⁻⁷ Stammlösung (1 l):</i> 1,4 g Calciumchlorid 4 g Kaliumchlorid 0,6 g Kaliumdihydrogenphosphat 1 g Magnesiumchlorid ($\times 6\text{H}_2\text{O}$) 1 g Magnesiumsulfat ($\times 7\text{H}_2\text{O}$) 80 g Natriumchlorid 0,9 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\times 7\text{H}_2\text{O}$) 10 g D-Glucose
Lysepuffer (High Pure Plasmid Isolation Kit)	0.2 M Natriumhydroxid 1 % SDS
MOPS-Puffer	<i>10⁻⁷ Stammlösung:</i> 0.2 M MOPS (pH 7.0) 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA (pH 8.0)
Neutralrot-Lösung	80 mg Neutralrot 1 l Natriumchloridlösung (0,9%)
Northern Blot-Blockierungspuffer	10 \times Blockierungslösung 1:10 in Northern Blot- Waschpuffer
Northern Blot-Waschpuffer	0.1 M Maleinsäure (pH 7.5) 0.15 M Natriumchlorid 0.3% Tween 20
PBS	137 mM Natriumchlorid 2.7 mM Kaliumchlorid 4.3 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1.4 mM Kaliumdihydrogenphosphat
RNA-Probenpuffer	250 μl Formamid (deionisiert) 83 μl Formaldehyd (37%) 50 μl 10 \times MOPS-Puffer 17 μl DEPC-behandeltes Wasser 0.5 μl Ethidiumbromid

SSC-Puffer	<i>20 ´ Stammlösung:</i> 3 M Natriumchlorid 0.3 M Trinatriumcitrat-dihydrat (pH 7.0)
Suspensionspuffer (High Pure Plasmid Isolation Kit)	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA 0.1 mg/ml RNase A
T4 DNA Ligase-Puffer	<i>10 ´ Stammlösung:</i> 0.3 M Tris-HCl (pH 7.8) 0.1 M DTT 0.1 M Magnesiumchlorid 10 mM ATP
T4 Polynukleotidkinase-Puffer	<i>10 ´ Stammlösung:</i> 0.7 M Tris-HCl (pH 7.6) 0.1 M Magnesiumchlorid 50mM DTT
TAE-Puffer	<i>50 ´ Stammlösung:</i> 242 g Tris-Base 57.1 ml Eisessig 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (auf ein 1 l Wasser) <i>Gebrauchslösung:</i> 40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 1 mM EDTA (pH 8.0)
Waschpuffer (High Pure PCR Product Purification Kit)	20 mM Natriumchlorid 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) 20 % Ethanol
Waschpuffer I (High Pure Plasmid Isolation Kit)	20 mM Tris-HCl (pH 6.6) 5 M Guanidiniumchlorid 37.5 % Ethanol

3.1.5. Geräte

Gerät:	Hersteller:
Analysenwaage FA 110-4i	Faust (Köln)
Automatischer Sequenzierer: ABI PRISM 310	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld (Hannover)
Brutschrank Heraeus	Heraeus (Hanau)
Elektrophoresekammer	MWG Biotech (Ebersberg)
ELISA Plate Reader: Emax	Molecular Devices (Gräfeling)
Thermo Spectra III	Tecan (Crailsheim)
Gammacounter LB2111	Berthold (Aliquippa, PA)
Gel-Dokumentationssystem TFX 20-M	MWG Biotech (Ebersberg)
Hybridisierungsschrank BFED 53	Binder (Tuttlingen)
Inkubationsschrank Certomat	B. Braun (Melsungen)
LightCycler	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Lumilmager Workstation	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Magnetrührer RCT	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop Fluovert	Leitz (Wetzlar)
Mikrowellenofen	Siemens (München)
Minishaker MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Pipetten: Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipetman 10 µl, 100 µl	Gilson (Villiers Le Bel, Frankreich)
Power supply PPS 200-1D	MWG Biotech (Ebersberg)
Sicherheitswerkbank HS 12	Heraeus (Hanau)
Spektrophotometer: BioSpec-1601	Shimadzu (Duisburg)
Thermocycler: GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
UV Crosslinker: Stratalinker 2400	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Wasserbad WB 10	Memmert (Schwabach)
Zentrifugen: Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)

3.1.6. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial:	Hersteller:
Combitips (1 ml; 2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Gewebekulturflaschen: Cellstar 25 ml, 250 ml	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturschalen: Cellstar	Greiner (Frickenhausen)
Glaskapillaren	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Hybond N ⁺ Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Mikrotiterplatten (96 well, costar 3595)	Corning (Corning, NY)
PCR-Röhrchen (0.2 ml)	Nunc (Karlsruhe)
Pipetten (Costar Stripette 1ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Corning (Corning, NY)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nürnberg)
Rundbodenröhrchen (14 ml)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
Safelock-Röhrchen (0.5 ml, 1.5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Whatman 3MM CHR Papier	Whatman (Maidstone, Großbritannien)
Zellkulturplatten (24 well, costar 3526)	Corning (Corning, NY)
Zellschaber (Costar cell scraper)	Corning (Corning, NY)
Zentrifugenröhrchen (Costar 15 ml, 50 ml)	Corning (Corning, NY)

3.2. Methoden

3.2.1. Kultivierung und Stimulation der INS-1 Zellen

3.2.1.1. Kultivierung der INS-1 Zellen

Die Expression von IA-2 und Insulin mRNA wurde in INS-1 Zellen untersucht, einer partiell Glukose sensitiven Ratten-Insulinoma-Zelllinie (Asfari et al., 1992). Die INS-1 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid in 250 ml Gewebekulturflaschen (Cellstar; Greiner) mit 20 ml RPMI-Medium II kultiviert. Für die Stimulationsexperimente wurden je 1×10^6 INS-1 Zellen in 25 ml Gewebekulturflaschen (Cellstar; Greiner) ausgesät und mit 5 ml RPMI-Medium II für 3 Tage kultiviert. Danach wurden die INS-1 Zellen für weitere 3 Tage mit 5 ml RPMI-Medium I (Basal-Medium) kultiviert und anschließend mit den Test-Reagenzien in Basal-Medium für 6, 24 bzw. 48 Stunden stimuliert.

3.2.1.2. Stimulation der INS-1 Zellen

Es wurden zwei Gruppen von Stimulationsexperimenten durchgeführt, in denen der Einfluss von metabolischen und hormonellen Faktoren (Gruppe 1) sowie der Einfluss von Zytokinen (Gruppe 2) auf die Expression von IA-2 untersucht werden sollte. Für die erste Gruppe von Experimenten wurden die Zellen mit Glucose (10, 15 und 21 mmol/l) sowie mit 10 µmol/l Forskolin bzw. 100 µmol/l IBMX (synthetische cAMP-Stimulantien), Glucagon (10 µmol/l), GLP-1 (0,1, 0,5 und 1 nmol/l), Somatostatin (10 µmol/l) und PGE₂ (0,5 µmol/l) stimuliert. Außerdem wurden die INS-1 Zellen mit 10 µmol/l Glucagon und 50 µmol/l Rp-cAMPS koinkubiert.

Der Einfluss von Zytokinen (Gruppe 2) wurde durch Stimulation mit IL-1β (0,1, 1, 10 und 50 U/ml), TNF-α (10, 100 und 500 U/ml), IFN-γ (1, 10, 100 und 1000 U/ml), IL-2 (10, 100 und 500 U/ml) und IL-4 (10, 50 und 100 ng/ml) untersucht. Außerdem wurden die Zellen mit zwei Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine (K1: 10 U/ml IL-1β, 100 U/ml IFN-γ und 500 U/ml TNF-α; K2: 100 U/ml IFN-γ und 500 U/ml TNF-α) stimuliert. Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator der Zytokinwirkung wurde durch Koinkubation der Zytokinkombination K1 mit 2 bzw. 4 mmol/l L-NMMA sowie durch Stimulation der INS-1 Zellen mit dem synthetischen NO-Donor SNAP (250 µmol/l) untersucht.

3.2.2. Isolierung, Kultivierung und Stimulation von pankreatischen Inseln

3.2.2.1. Isolierung der pankreatischen Inseln aus Ratten

Nach Tötung der Ratten durch eine Überdosis Nembutal wurde die Bauchhöhle freigelegt und der Pankreas durch retrograde Injektion von 20 ml Neutralrot-Lösung in die Aorta abdominalis rot angefärbt. Der Pankreas wurde entnommen und in 25 ml eisgekühlte Hanks-Lösung gelegt, von umgebendem Fett gesäubert und mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten. Die Pankreasteilchen wurden mit 15 ml Hanks-Lösung gewaschen, 30 sec bei $200 \times g$ zentrifugiert und in 5 ml Hanks-Lösung in einem 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (Corning) wiederaufgenommen. Zu diesem Gemisch wurden 5 mg Kollagenase/ml zugegeben. Der Verdau des exokrinen Gewebes erfolgte durch 10-15 min Inkubation dieses Ansatzes im Wasserbad bei 37°C. Durch Zugabe von 25 ml eisgekühlter Hanks-Lösung wurde der Verdau gestoppt und das Gemisch 2 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den angereicherten Inseln dreimal mit gekühlter Hanks-Lösung (mit 1% Penicillin/Streptomycin) gewaschen und je 2 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 18 ml Ficoll-Stammlösung resuspendiert und je zur Hälfte auf zwei 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (Corning) verteilt. Anschließend wurde ein Ficoll-Gradient durch behutsames Überschichten dieser Suspension mit je 4 ml Ficoll I-, Ficoll II- und Ficoll III-Lösung aufgebaut und die Röhrchen 20 min bei $200 \times g$ ungebremst zentrifugiert. Die Inseln, die nach der Zentrifugation an der Grenze zwischen Ficoll II- und Ficoll III-Lösung angereichert sind, wurden mit einer Pipette entnommen, in ein neues 50 ml Röhrchen übertragen und dreimal mit je mit 40 ml Hanks-Lösung gewaschen und je 2 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Inseln in 4 ml RPMI-Lösung (mit 100 mg/dl Glucose, 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert, in eine Petrischale überführt und unter dem Mikroskop von restlichen Verunreinigungen (Bindegewebe und Lymphknoten) befreit und gezählt. Die ausgelesenen Inseln wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit 5 ml RPMI-Lösung gewaschen, 2 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und in RPMI-Medium I (Basalmedium) resuspendiert.

3.2.2.2. Kultivierung und Stimulation der pankreatischen Inseln

Die isolierten Inseln wurden in 24-well-Zellkulturplatten für 2 Tage in RPMI-Medium I (Basalmedium) kultiviert. Dabei wurden pro Vertiefung (well) 20 Inseln in je 1 ml Medium verteilt. Die Inseln wurden 48 Stunden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin, 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX bzw. 10 mmol/l Glucose stimuliert.

3.2.3. Bestimmung der metabolischen Aktivität der INS-1 Zellen

Die metabolische Aktivität der INS-1 Zellen nach Stimulation mit Zytokinen wurde mit dem CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) bestimmt. Der Assay beruht auf der NAD(P)H-abhängigen Reduktion eines Tetrazoliumsalzes (MTS) zu seinem Formazanprodukt durch Dehydrogenasen in biologisch aktiven Zellen. Das MTS-Formazanprodukt ist im Zellkulturmedium löslich und kann daher direkt durch Messung der Absorption bei 490 nm bestimmt werden. Die Menge des gebildeten MTS-Formazanproduktes ist direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen (Cory et al., 1991).

In einer 96-well-Platte wurden 1×10^4 INS-1 Zellen pro Vertiefung ausgesät und in 100 μ l RPMI-Medium für 3 Tage kultiviert und dann für 6 bzw. 24 Stunden mit Zytokinen in 100 μ l Basal-Medium stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen für eine Standardkurve (1×10^3 bis 2×10^4 Zellen pro Vertiefung) ausgesät. Nach der Stimulation der Zellen wurden pro Vertiefung 20 μ l CellTiter 96 AQueous One Solution zugegeben und die Zellen für weitere 3 Stunden kultiviert. Danach wurde die Absorption bei 490 nm mit einem ELISA Plate Reader (Thermo Spectra III, Tecan) gemessen und die Anzahl der lebenden Zellen anhand der Standardkurve berechnet. Alle Werte wurden als Dreifachbestimmung gemessen.

3.2.4. Bestimmung von Insulin

Das von den INS-1 Zellen sezernierte Insulin wurde in den Zellüberständen mittels eines Radioimmunoassays (RIA) bestimmt. Es wurde der Rat Insulin RIA Kit von LINCO verwendet. Dabei werden radioaktiv markiertes Insulin (125 -Jod-Insulin) und ein in Meerschweinchen produzierter Ratten-Insulin Antikörper zu jeder Probe zugegeben. Das in der Probe enthaltene Insulin und das zugesetzte 125 -Jod-Insulin konkurrieren um die Bindungsstelle des Antikörpers. Nach Präzipitation der Insulin-Antikörper-Komplexe wird die Konzentration des 125 -Jod-Insulin im Pellet bestimmt, welche umgekehrt proportional zur Insulinkonzentration in der Proben ist.

In Probenröhrchen wurden 100 μ l Probe (Zellkulturüberstand der INS-Zellen 1:100 verdünnt mit Assay-Puffer) bzw. 100 μ l Insulinstandardlösung (0,1 ng/ml bis 10 ng/ml Insulin) pipettiert und mit 100 μ l 125 -Jod-Insulin sowie 100 μ l Ratten-Insulin-Antikörper versetzt. Die Proben wurden gut gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu jeder Probe 1 ml Präzipitationsreagenz zugegeben, 20 min bei 4°C inkubiert und 30 min bei 3000 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die im Pellet verbliebene Radioaktivität im Gammacounter (LB2111; Berthold) gemessen. Die Insulinkonzentration in den Proben

wurde anhand einer Standardkurve, die aus den mitgeführten Insulinstandards erstellt wurde, berechnet. Alle Werte wurden als Doppelbestimmung gemessen.

3.2.5. Bestimmung von Nitrit

Das nach Stimulation der INS-1 Zellen mit Zytokinen produzierte Stickstoffmonoxid (NO) wird zu Nitrit oxidiert. Das Nitrit wurde im Zellkulturüberstand der INS-1 Zellen mittels des Griess-Tests nachgewiesen (Green et al., 1982).

Dazu wurden je 50 μ l Zellkulturüberstand von INS-1 Zellen in die Vertiefungen einer 96-well-Platte pipettiert. Für die Standardkurve wurden zusätzlich je 50 μ l Natriumnitritlösung in einer seriellen Verdünnung von 0,75 μ mol/l bis 100 μ mol/l pipettiert. In je 10 ml 2,5%iger Phosphorsäure wurden 100 mg Sulfanilamid (Lösung A) bzw. 30 mg N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (Lösung B) gelöst. Lösung A und Lösung B wurden auf 37°C erwärmt und im Verhältnis 1:1 gemischt (Lösung C). Je 50 μ l Lösung C wurden zu den Proben in den Vertiefungen der 96-well-Platte pipettiert und die Absorption bei 550 nm in einem ELISA Plate Reader (Emax, Molecular Devices) gemessen. Alle Proben und Standards wurden als Dreifachbestimmung gemessen. Die Nitritkonzentration in den Proben wurde anhand der Standardkurve berechnet.

3.2.6. Grundlegende molekularbiologische Methoden

3.2.6.1. Isolierung der RNA aus INS-1 Zellen und primären Inseln

Die RNA wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) extrahiert. Dabei werden die Zellen durch Inkubation in einem Guanidiniumchlorid-haltigen Lyse- und Bindungspuffer lysiert und die RNA nachfolgend an eine Glasfasermatrix gebunden. Nach dem Verdau von kontaminierender genomischer DNA durch Inkubation mit DNase I werden Verunreinigungen durch zwei Waschschriffe entfernt und die RNA (Gesamt-RNA) von der Matrix eluiert.

Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Gewebekulturflasche abgeschabt, in 3 ml PBS aufgenommen und 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 μ l PBS resuspendiert und mit 400 μ l Lyse- und Bindungspuffer versetzt. Die Proben wurden dann in High Spin Filter-Röhrchen pipettiert, die die Glasfasermatrix enthalten, und eine Minute mit $10000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Proben wurden mit 100 μ l DNase I Lösung für 15 min bei

RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Proben mit je 500 µl RNA-Waschpuffer I und II wurde die RNA mit 50 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Spektrophotometer (Shimadzu) bestimmt. Die RNA wurde dazu 1:50 in TE-Puffer verdünnt und die OD bei 260 nm und bei 280 nm nach Kalibrierung des Photometers mit TE-Puffer gemessen. Die Messung der OD bei 260 nm erlaubt mittels des Lambert-Beer-Gesetzes ($OD = \text{Konzentration} \times \text{Schichtdicke der Kuvette} \times \text{Extinktionsfaktor}$) die Berechnung der RNA-Konzentration nach der Formel: $\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ermöglicht eine Beurteilung der Reinheit der isolierten RNA.

3.2.6.2. Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese)

Die Synthese einzelsträngiger cDNA, die als Template für die PCR verwendet werden kann, erfolgt durch reverse Transkription (RT) der isolierten RNA. Die RT ist eine enzymatisch katalysierte Reaktion unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die mRNA als Matrize für die Synthese des komplementären DNA-Stranges dient. Die cDNA-Synthese wird durch Bindung eines Primers an die mRNA initiiert.

Für die cDNA-Synthese mit RNA aus INS-1 Zellen wurde die Superscript-RT (Life Technologies) verwendet, während die RNA aus primären Inseln mit Expand-RT (Roche) umgeschrieben wurde. Es wurden 4 µg Gesamt-RNA (für die kompetitive PCR) bzw. 500 ng Gesamt-RNA (für die LightCycler-PCR) zusammen mit 50 pmol Oligo(dT)₁₅-Primer in ein 200 µl dünnwandiges PCR-Röhrchen pipettiert, mit DEPC-behandeltem Wasser auf 25 µl aufgefüllt und 10 min bei 65°C im Thermocycler (Perkin Elmer) inkubiert. Dann wurde folgendes Reaktionsgemisch hinzugefügt:

- 8 µl 5 × First Strand Puffer
- 4 µl DTT (100 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript-RT: 200 U/µl, Expand-RT: 50 U/µl)

Dieser Reaktionsansatz wurde im Thermocycler 1 Stunde bei 37°C (bei Verwendung von Superscript-RT) bzw. 1 Stunde bei 42°C (bei Verwendung von Expand-RT) inkubiert.

Aliquots dieses Reaktionsansatzes wurden direkt für die konventionelle und für die kompetitive PCR eingesetzt. Für die LightCycler-PCR wurde die synthetisierte cDNA mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) gereinigt. Dabei wird die DNA an eine Glasfasermatrix gebunden und durch zwei aufeinanderfolgende Wasch- und Zentrifugationsschritte werden kontaminierende Bestandteile (z.B. Primer, Nukleotide, Salze) abgetrennt. Der Reaktionsansatz wurde mit deionisiertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit 500 µl Bindungspuffer versetzt und auf die Glasfasermatrix (in einem High Spin Filter-Röhrchen) aufgetragen. Die cDNA wurde je einmal mit 500 µl und mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und dann mit 100 µl Elutionspuffer eluiert.

3.2.6.3. Klonierung der Template cDNA-Fragmente

Fragmente von β -Aktin, IA-2 und Insulin wurden aus cDNA von INS-1 Zellen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in pGEM-Vektoren (Promega) einkloniert. Diese Konstrukte wurden anschließend verwendet, um Sonden für die Northern Blot Analyse und interne Standards für die kompetitive PCR zu generieren sowie als externe Standards für die LightCycler-PCR eingesetzt.

3.2.6.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine *in vitro* Methode für die enzymkatalysierte Synthese definierter DNA-Abschnitte dar. In mehreren Amplifizierungsrunden, die aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der spezifischen Primer (Annealing) und Verlängerung der Primer entlang der Matrizen-DNA durch eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase (Elongation) bestehen, erfolgt eine Anreicherung spezifischer, definierter DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987).

Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt. Dabei wurden für jede PCR zwei Reaktionsgemische wie angegeben auf Eis in ein 200 µl dünnwandiges PCR-Röhrchen vorpipettiert und unmittelbar vor Beginn der PCR vereinigt:

Reaktionsgemisch I: 1,0 µl dNTP-Mix (10 mM)
0,5 µl 5'-Primer (50 µM)
0,5 µl 3'-Primer (50 µM)
2,0 µl cDNA
20,0 µl deionisiertes Wasser

Reaktionsgemisch II: 5,0 µl 10 × Expand High Fidelity Puffer
 19,5 µl deionisiertes Wasser
 0,5 µl Expand High Fidelity Enzym Mix (3.5 U/µl)

Die DNA wurde im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert: initiale Denaturierung der DNA für 2 min bei 94°C, zyklische Wiederholung von 1) Denaturierung für 15 sec bei 94°C, 2) Primer-Hybridisierung für 30 sec bei einer Primer-spezifischen Temperatur und 3) Elongation für 1 min bei 72°C (Primersequenzen und Annealing-temperaturen sowie Zyklenzahl der PCR: siehe Tabelle 2) sowie finale Elongation für 7 min bei 72°C.

cDNA-Fragment	Primersequenz (A: 5'-Primer, B: 3'-Primer)	Produktlänge [Bp]	Annealingtemperatur [°C]	Zyklenzahl
β-Aktin (1)	A: CTATCGGCAATGAGCGGTTC B: GAGTTGGGGGTGGCTTTTG	759	56	30
β-Aktin (2)	A: ACCCACA CTGTGCCCATCTA B: GCCACAGGATTCCATACCCA	342	58	30
IA-2	A: CTGGTGAAGTCTGAACTGGAAG B: CAGCATAACGATGACAGTGCAG	822	63	35
Insulin-1	A: CTGCCCAGGCTTTTGTCA B: AGGGGTGGGCGGGGAGTGGT	336	51	27

Tab. 2: Primersequenzen, Annealingtemperatur und Zyklenzahl für die RT-PCR von β-Aktin, IA-2 und Insulin-1

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem 2%igem Agarosegel, versetzt mit 1 µg/ml Ethidiumbromid, aufgetrennt. Je 20 µl Probe wurde mit 3 µl DNA-Probenpuffer (Sigma) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentlänge der amplifizierten DNA wurde außerdem ein Molekulargewichtsmarker (100 Bp DNA Ladder, Promega) auf dem Gel mitgeführt. Als Laufpuffer diente 1 × TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 95 Volt (constant voltage) für 1 Stunde in einem Minigelsystem (MWG Biotech). Die durch Fluoreszenz unter UV-Licht detektierten Banden der amplifizierten DNA wurden mit einem Geldokumentations-System (MWG Biotech) photographisch dokumentiert.

3.2.6.3.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mittels PCR amplifizierte und elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoTrap Gel Extraction Kit (Clontech) aus dem Gel eluiert. Dabei wird die DNA an eine suspendierte Silica-Matrix gebunden, durch mehrere Waschschriffe von Kontaminationen gereinigt und in Wasser reeluiert.

Zu dem ausgeschnittenen Agarosegel-Stück wurden 600 µl Puffer NT1 (Bindungspuffer) und 10 µl NucleoTrap-Suspension (suspendierte Silica-Matrix) pipettiert und die Probe für 10 min bei 50°C inkubiert. Die Probe wurde 1 min bei 10000 × g zentrifugiert und das Pellet zweimal mit je 500 µl Waschpuffer NT2 und zweimal mit je 500 µl Waschpuffer NT3 gewaschen und dann 15 min bei RT luftgetrocknet. Aus dem trockenen Pellet wurde die DNA durch Inkubation mit 20 µl deionisiertem Wasser (5 min bei 50°C) eluiert.

3.2.6.3.3. Ligation der DNA-Fragmente mit pGEM-Vektoren

Die DNA-Fragmente wurden mit Plasmid-Klonierungsvektoren (pGEM-4Z und pGEM-T Easy) ligiert. Plasmide sind selbst-replizierende, zirkuläre, extrachromosomale DNA-Moleküle, die in der Natur in einer Vielzahl von Bakterienspezies vorkommen und in der Molekularbiologie für die Klonierung und Manipulation von DNA-Sequenzen Verwendung finden.

Das β-Aktin (1)- und das Insulinfragment wurden mit dem pGEM-4Z Vektor (Promega) ligiert. Dazu wurde 1 µg des pGEM-4Z Vektors für 3 Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Hinc II (Promega) geschnitten und mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) gereinigt (siehe 3.2.5.2.). Die Enden der durch PCR amplifizierte cDNA-Fragmente wurden enzymkatalysiert durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt und durch T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. In ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden pipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert:

- 20 µl eluiertes cDNA-Fragment
- 10 µl 10 × Polynukleotidkinase-Puffer
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl ATP (100 mM)
- 1 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (5 U/µl; Promega)
- 1 µl Polynukleotidkinase (10 U/µl; Promega)
- 65 µl deionisiertes Wasser

Danach wurde das cDNA-Fragment ebenfalls mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) gereinigt.

Das β -Aktin (2)- und das IA-2-Fragment wurden mit dem pGEM-T Easy Vektor (Promega) ligiert. Der pGEM-T Easy Vektor ist ein durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Eco R V linearisierter Plasmidvektor, an dessen 3'-Enden jeweils ein zusätzliches Thymidin-Nukleotid angehängt wurde. Da bei der PCR mit *Taq* DNA-Polymerase matrizenunabhängig ein Desoxyadenosin an die 3'-Enden der amplifizierten DNA-Fragmente eingebaut wird, kann das gereinigte DNA-Fragment direkt mit dem pGEM-T Easy Vektor ligiert werden.

Für die Ligation sowohl mit dem pGEM-4Z als auch mit dem pGEM-T Easy Vektor wurde folgender Reaktionsansatz in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert und über Nacht bei 15°C inkubiert:

- 7 μ l gereinigtes cDNA-Fragment
- 1 μ l 10 \times T4 DNA-Ligasepuffer
- 1 μ l pGEM-4Z oder pGEM-T Easy Vektor
- 1 μ l T4 DNA-Ligase (3 U/ μ l; Promega)

3.2.6.3.4. Transformation von *E. coli* Bakterien

Für die Transformation wurden zu 25 μ l kompetenten *E. coli* Bakterien (TOP 10F' One Shot; Invitrogen) 5 μ l Ligations-Reaktionsansatz pipettiert. Dieser Ansatz wurde auf Eis für 30 min inkubiert, für die Hitzeschock-Transformation der Bakterien 50 sec bei 42°C inkubiert und noch einmal 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 400 μ l SOC-Medium zugegeben und die Probe für 1 Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt. 200 μ l der Probe wurden auf eine LB-Agar-Platte mit 50 μ g/ml Ampicillin, 0,5 mmol/l IPTG und 20 μ g/ml X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Unter diesen Kultivierungsbedingungen können Bakterien, die nur mit dem religierten Vektor transformiert sind, das Enzym β -Galaktosidase exprimieren und X-Gal zu einem blauen Farbstoff spalten, während Bakterien, die mit dem Vektor-cDNA-Konstrukt transformiert sind, ungefärbt bleiben. Positive (nichtgefärbte) Bakterienklone wurden für die Isolierung der Plasmid-DNA selektiert.

3.2.6.3.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde der High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) eingesetzt. Dabei werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen, chromosomale bakterielle DNA sowie Zelltrümmer werden ausgefällt und der plasmidhaltige Überstand mit High Pure Filter-Röhrchen gereinigt. Die Reinigung erfolgt durch Bindung der DNA an eine Glasfasermatrix, an die sich mehrere Waschschrte und die Elution der DNA anschließen.

Die von der LB-Agar-Platte gepickten transformierten *E. coli* Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin enthaltend) im Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde 5 min bei 3000 × g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl Suspensionspuffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden zunächst 250 µl Lysepuffer zugegeben und 2 min bei RT inkubiert, und danach 350 µl Bindepuffer zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16000 × g wurde der Überstand in High Pure Filter-Röhrchen pipettiert, 1 min bei 16000 × g zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die DNA je einmal mit 500 µl Waschpuffer I und mit 700 µl Waschpuffer II gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl deionisiertem Wasser eluiert.

3.2.6.4. DNA-Sequenzierung

Alle klonierten cDNA-Fragmente wurden sequenziert und mittels des BLAST-Algorithmus mit den in der Gen-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) publizierten Originalsequenzen verglichen. Für die Sequenzierung wurde ein automatisches Sequenzier-System (PE Applied Biosystems) verwendet. Aus der gereinigten DNA wurden zunächst in einer PCR mit einem Sequenzierprimer einzelsträngige, mit dRhodamin-Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Fragmente generiert, die dann durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion identifiziert wurden.

Für die Sequenzier-PCR wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) eingesetzt. Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

- 3,5 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix (enthält Puffer, Magnesiumchlorid, DNA Polymerase, dNTPs und dRhodamin-markierte ddNTPs)
- 500 ng DNA-Template (gereinigt mit High Pure Plasmid Isolation Kit)
- 3 pmol Primer (M13 forward- oder M13 revers Primer)
- deionisiertes Wasser (auf 20 µl Gesamtvolumen)

Die DNA wurde in einem Thermocycler (PE Applied Biosystems) nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 26 Zyklen mit 96°C, 10 sec (Denaturierung), 50°C, 5 sec (Primer-Annealing) und 60°C, 4 min (Elongation).

Nach der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Ethanolpräzipitation gereinigt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl deionisiertem Wasser, 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 250 µl Ethanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 16000 × g zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl Template Suppression Puffer (PE Applied Biosystems) reeluiert und 2 min bei 95°C denaturiert.

Die dRhodamin-markierten DNA-Fragmente wurde im ABI 310 Sequenzier-System durch Elektrophorese (40 min bei 7.5 kV) in einer mit POP6-Polymer gefüllten Kapillare (Länge: 47 cm, Durchmesser: 50 µm) aufgetrennt und die Nukleotidsequenz durch Detektion der Laser-induzierten Fluoreszenz bestimmt.

3.2.7. Northern Blot Analyse

Der Northern Blot ist eine konventionelle Methode, um die Expression von spezifischen mRNA Sequenzen zu detektieren. Für die Northern Blot Analyse wurde das nichtradioaktive DIG-System verwendet, bei dem in-vitro transkribierte anti-sense mRNA mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) markiert und als Hybridisierungssonde für den Northern Blot eingesetzt wird (Martin et al., 1990).

3.2.7.1. Elektrophorese und Blotten der RNA

Die RNA-Proben (je 4 µg RNA / Probe) wurden in je 4 Volumina RNA-Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 65°C denaturiert und auf einem denaturierenden 1%igen Agarosegel mit 5% Formaldehyd elektrophoretisch für 3 Stunden bei 90 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 × MOPS-Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 3 Stunden in DEPC-behandeltes Wasser eingelegt, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen.

Die RNA wurde durch Kapillartransfer über Nacht vom Gel auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) geblottet. Als Transferpuffer wurde 20 × SSC Puffer verwendet. Abbildung 6 zeigt den Aufbau des Blot-Sandwich für einen aufwärts gerichteten Kapillartransfer.

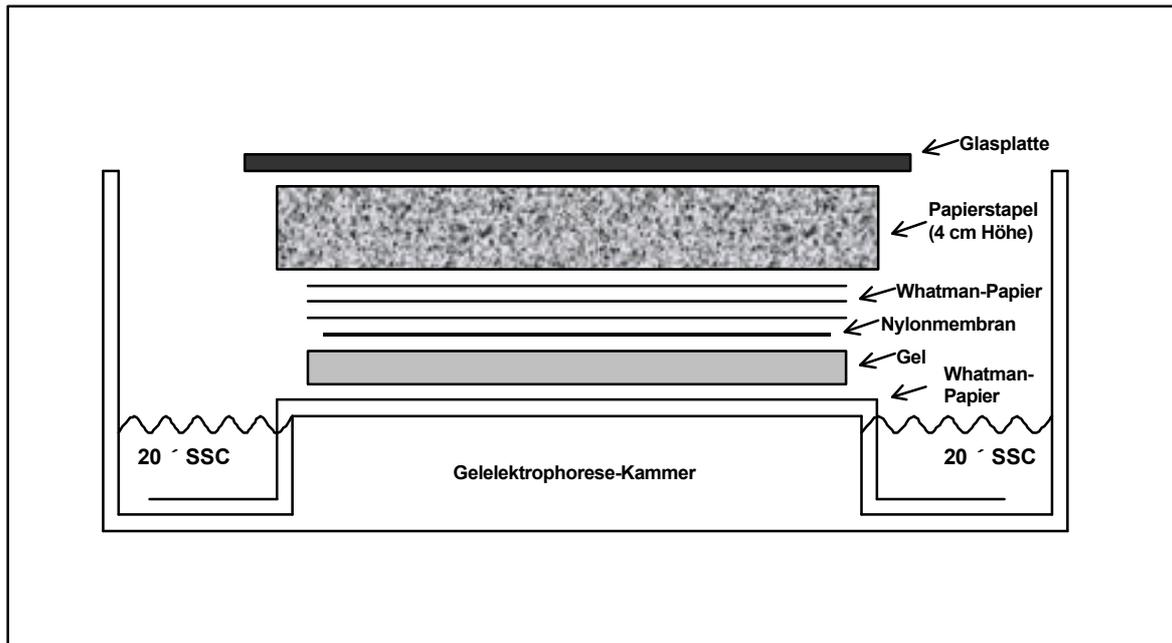


Abb. 6: Blot-Sandwich für den Kapillartransfer von RNA

Nach dem Blotten wurde die RNA durch UV-Quervernetzung bei einer Energie von 120 mJ mit einem UV Crosslinker (Stratagene) auf der Membran immobilisiert und die Banden der 18S- und 28S- rRNA markiert.

3.2.7.2. Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die Digoxigenin (DIG)- markierten RNA-Sonden wurden durch in-vitro Transkription der klonierten cDNA-Fragmente von β -Aktin, IA-2 und Insulin-1 der Ratte hergestellt.

Die in die pGEM-Plasmidvektoren klonierte Template-cDNA wurde durch Restriktionsverdau (37°C, 3 Stunden) linearisiert. Als Restriktionsenzyme wurden verwendet: Hind III (für β -Aktin), Spe I (für IA-2) und Xba I (für Insulin-1). Die linearisierte DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolfällung gereinigt und in DEPC-behandeltem Wasser reeluiert.

Für die in-vitro Transkription und DIG-Markierung wurde der DIG RNA Labeling Kit (Roche) eingesetzt. Folgende Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge für die Markierungsreaktionen pipettiert:

- 1 µg linearisierte, gereinigte Template cDNA (in 13 µl DEPC-behandeltem Wasser)
- 2 µl 10× NTP Markierungsmix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP)
- 2 µl 10× Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA-Polymerase (SP6-RNA-Polymerase für β-Aktin und Insulin-1, T7-RNA-Polymerase für IA-2)

Die Markierungsreaktionen wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert und mit EDTA-Lösung (0,2 M, pH 8,0) gestoppt. Die synthetisierte DIG-markierte RNA wurde mit 2,5 µl Lithiumchlorid (4 M) und 75 µl Ethanol 1 Stunde bei -70°C präzipitiert, 15 min bei 16000 × g zentrifugiert, mit 50 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser reeluiert.

3.2.7.3. Hybridisierung und Detektion der mRNA

Die Nylonmembran mit der geblotteten RNA wurde eine Stunde bei 68°C in 20 ml DIG Easy Hyb Lösung (Roche) prähybridisiert. Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden 10 min bei 100°C denaturiert und in 5 ml DIG Easy Hyb Lösung pipettiert (2 µl Insulin-Sonde und je 5 µl β-Aktin- und IA-2-Sonde). Mit dieser Hybridisierungslösung wurde die Nylonmembran über Nacht bei 68°C inkubiert. Um die nichtgebundenen Sonden zu entfernen, wurde die Nylonmembran dann zweimal mit niedriger Stringenz je 5 min bei RT mit je 50 ml Waschlösung I (2 × SSC, 0,1% SDS) und zweimal mit hoher Stringenz je 15 min bei 68°C mit je 50 ml Waschlösung II (0,1 × SSC, 0,1% SDS) gewaschen.

Die Detektion der RNA erfolgte durch Chemilumineszenz, wobei ein Lichtsignal an der Stelle der hybridisierten Sonde generiert wird. Dazu wurde die Membran 5 min bei RT in 25 ml Northern Blot-Waschpuffer gewaschen und danach 30 min bei RT in 50 ml Northern Blot-Blockierungspuffer inkubiert. Ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:10000 in 25 ml Northern Blot-Blockierungspuffer verdünnt und die Membran mit dieser Lösung 30 min bei RT inkubiert. Um den nichtgebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran danach zweimal 15 min bei RT mit je 50 ml Northern Blot-Waschpuffer gewaschen. Nach einer kurzen Präinkubation mit 25 ml Northern Blot-Detektionspuffer (5 min bei RT) wurde die Membran 15 min bei 37°C mit 2 ml CSPD-Lösung (CSPD 1:100 verdünnt in Northern Blot-Detektionspuffer) inkubiert. Für die Detektion und

Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde ein Lumilmager-System (Roche) verwendet.

3.2.8. Kompetitive RT-PCR

Die kompetitive PCR ermöglicht eine exakte Quantifizierung von revers transkribierten mRNA-Proben. Sie beruht darauf, dass die cDNA des Zielgens mit einer bekannten Menge einer internen Standard-DNA (Kompetitorfragment) in einem PCR-Röhrchen unter identischen Bedingungen koamplifiziert wird. Mittels einer Verdünnungsreihe des Kompetitorfragmentes oder der Probe kann die unbekannte Konzentration des Zielgens bestimmt werden. Die DNA-Sequenzen des Zielgens und des Kompetitorfragments müssen dabei möglichst ähnlich sein und gleiche Bindungsstellen für die 5'- und 3'-Primer aufweisen (Platzer et al., 1994). Weil die reverse Transkription verschiedener RNA-Proben häufig mit unterschiedlicher Effizienz abläuft, ist außerdem eine zusätzliche Normalisierung der Proben durch Amplifizierung eines "housekeeping" Gens wie z.B. β -Aktin erforderlich.

3.2.8.1. Herstellung der internen Standards für die kompetitive PCR

Die internen Standards (Kompetitorfragmente) für die kompetitive PCR wurden mittels des Erase-a-Base Systems (Promega) hergestellt. Dabei wurde eine von Henikoff (1984) entwickelte Methode modifiziert, um jeweils etwa 100 Basenpaare aus dem β -Aktin (1)- und dem IA-2- Fragment zu deletieren, wobei die für die PCR benötigten Primer-Bindungsstellen erhalten bleiben. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Enzyms Exonuklease III, DNA ausgehend von Restriktionsstellen mit glatten oder 5'-überhängenden Enden zu verdauen. Exonuklease III verdaut DNA in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur mit gleichbleibender Geschwindigkeit, wodurch es ermöglicht wird, Deletionsmutanten mit vorbestimmter DNA-Länge zu erhalten. Die Herstellung der Kompetitorfragmente für β -Aktin und IA-2 ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

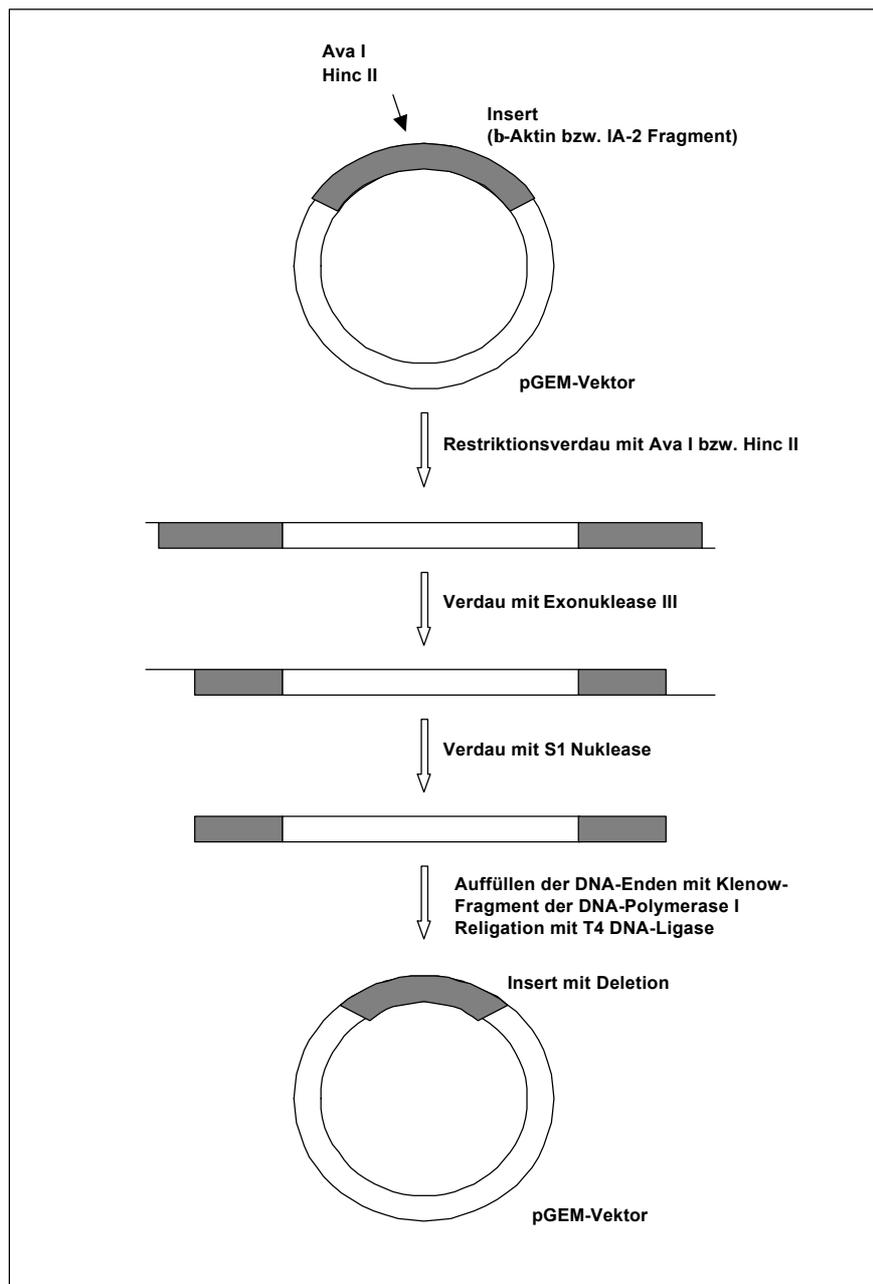


Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung von internen Standards für die kompetitive PCR

Die in pGEM-Vektoren einklonierten cDNA-Fragmente wurden durch Restriktionsverdau mit Hinc II (β -Aktin- Fragment) bzw. Ava I (IA-2- Fragment) linearisiert. Dazu wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen folgender Reaktionsansatz pipettiert und 3 Stunden bei 37°C inkubiert:

- 5 μ g Plasmid-DNA (cDNA-Fragmente in pGEM-Vektoren)
- 10 μ l 10 \times Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym (Promega)
- 10 μ l acetyliertes BSA (1 mg/ml; Promega)
- 3 μ l Restriktionsenzym Hinc II bzw. Ava I (10 U/ μ l; Promega)
- 72 μ l deionisiertes Wasser

Nach dem Restriktionsverdau wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt und in 10 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Für den Verdau mit Exonuklease III wurde in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen folgender Reaktionsansatz pipettiert und auf Eis inkubiert:

- 10 µl resuspendierte, linearisierte DNA
- 6 µl Exonuklease III Puffer
- 42 µl deionisiertes Wasser
- 2 µl Exonuklease III (200 U/µl)

Bei Raumtemperatur beträgt die Geschwindigkeit des DNA-Verdaus durch Exonuklease III etwa 80 Basen/Minute. Nach 1 min Inkubation bei RT wurden in Intervallen von 15 sec fünfmal je 2,5 µl des Reaktionsansatzes entnommen und zu je 7,5 µl S1 Nuklease-Mix (20 µl deionisiertes Wasser, 5,5 µl 7,4 × S1 Nuklease Puffer, 12 µl S1 Nuklease (50 U/µl)) pipettiert, gut gemischt und bei RT für 30 min inkubiert. Der Verdau mit S1 Nuklease entfernt die nach dem Exonuklease III- Verdau verbliebenen einzelsträngigen DNA-Enden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 1 µl S1 Nuklease Stop Puffer beendet und anschließend wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei 70°C inkubiert, um die S1 Nuklease zu inaktivieren. Die DNA wurde durch Zugabe von je 3 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 20 µl absolutem Ethanol sowie Inkubation bei -20°C für 30 min und Zentrifugation für 15 min mit 16000 × g präzipitiert und nach Waschen mit je 500 µl 70%igem Ethanol in je 9 µl TE-Puffer resuspendiert. Zu den resuspendierten DNA-Proben wurde je 1 µl Klenow-Mix (5 µl Klenow-Puffer, 0,5 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (5 U/µl)) pipettiert, 3 min bei 37°C inkubiert und je 1 µl 125 µM dNTP-Mix zugegeben. Diese Reaktionsansätze wurden für weitere 10 min bei 37°C inkubiert, um die Enden der DNA zu glätten, und danach für 10 min bei 65°C inkubiert, um das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zu inaktivieren. Die DNA wurde dann mit T4 DNA-Ligase (Promega) religiert (siehe 3.2.6.3.3.) und in *E.coli* Bakterien transformiert (siehe 3.2.6.3.4.). Für jeden der fünf Zeitpunkte des Verdaus mit Exonuklease III wurden je zwei rekombinante Bakterienklone gepickt und deren Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.2.6.3.5.). Die cDNA-Inserts wurden aus den Plasmidvektoren durch Restriktionsverdau mit EcoR I und Hind III (β-Aktin-Fragment) bzw. mit Not I (IA-2-Fragment) ausgeschnitten und die Länge der DNA durch Auftragung auf ein 2%iges Agarosegel analysiert. Anschließend wurden die selektierten Deletionsmutanten (Kontrollfragmente) sequenziert, um die genaue Länge der Deletion zu bestimmen.

Die Kontrollfragmente wurden vor dem Einsatz in der kompetitiven RT-PCR durch Restriktionsverdau mit EcoR I (β-Aktin-Fragment) bzw. mit Pst I (IA-2-Fragment) linearisiert

und die DNA-Konzentration wurde durch spektrophotometrische Messung bestimmt. Aus der DNA-Konzentration wurde die enthaltene Menge an β -Aktin- bzw. IA-2-Kompetitorfragment (Standard) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Standardkonzentration [mol/}\mu\text{l]} = \frac{\text{DNA-Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{Anzahl der Basenpaare} \times 660 \text{ g/mol}}$$

Die Kompetitorfragmente wurden auf eine Konzentration von 1 fmol/ μ l eingestellt. Dann wurde eine Verdünnungsreihe der Kompetitorfragmente hergestellt und mittels PCR die Verdünnungsstufe bestimmt, bei der gerade noch eine Bande auf einem Ethidiumbromidgel nachweisbar war. Diese Konzentration wurde als 1 AU ("arbitrary unit") bezeichnet.

3.2.8.2. Quantifizierung der IA-2 mRNA mittels kompetitiver RT-PCR

Die kompetitive PCR wurde durch Koamplifizierung der cDNA-Proben mit bekannten konstanten Mengen der Kontrollfragmente durchgeführt. Jeder PCR-Reaktionsansatz enthielt in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l je 1,5 mmol/l Magnesiumchlorid, 200 μ mol/l dNTP-Mix, 1 μ mol/l 5'- und 3'- Primer, 0,86 U High Fidelity DNA Polymerase Mix (Roche), 1 μ l Kontrollfragment sowie cDNA in der jeweiligen Verdünnung. Die Reaktionsansätze wurden wie im Kapitel 3.2.6.3.1. beschrieben pipettiert. Es wurden die in Tabelle 2 angegebenen Primer für β -Aktin (1) und IA-2 verwendet.

Um die cDNA-Proben auf gleiche Mengen eines konstitutiv exprimierten "housekeeping"-Gens zu normalisieren, wurde zunächst β -Aktin mit 27 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 56°C für 30 sec und 72°C für 1 min amplifiziert, wobei zu jedem PCR-Reaktionsansatz 0,003 fmol β -Aktin-Kontrollfragment zugegeben wurden. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 2%-igem Agarosegel aufgetrennt, durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert und die relative Intensität der β -Aktin cDNA- und Kontrollfragment-Banden mit dem Lumilmager-System (Roche) bestimmt. Die PCR wurde mit seriellen Verdünnungen der cDNA Proben (bei gleichbleibender Menge Kontrollfragment) wiederholt, bis Banden mit gleicher relativer Intensität für die cDNA-Probe und das Kontrollfragment erhalten wurden.

Die auf β -Aktin cDNA normalisierten Proben wurden dann verwendet, um die cDNA des Zielgens IA-2 zu amplifizieren. Die PCR auf IA-2 wurde mit 29 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 63°C für 30 sec und 72°C für 1 min durchgeführt, wobei zu jedem Reaktionsansatz 0,05 fmol IA-2- Kontrollfragment pipettiert wurde. Nach Auftrennung auf einem 2%-igem Agarosegel

wurden die relativen Intensitäten der Banden für die cDNA und das Kontrollfragment wie beim β -Aktin bestimmt. Da bei der kompetitiven PCR die cDNA und das Kontrollfragment um die im Reaktionsansatz vorhandenen Reagenzien konkurrieren, ist es möglich, durch Vergleich der relativen Intensität der cDNA- und Kontrollfragment- Banden die in der Probe enthaltene cDNA zu quantifizieren. Dabei ist die Konzentration der cDNA in der Probe umso größer, je höher die relative Intensität der IA-2 cDNA-Bande und je niedriger die relative Intensität der IA-2 Kontrollfragment-Bande ist. Die relativen Änderungen der Expression von IA-2 in den stimulierten Proben wurden in Prozent der basalen Werte der unstimulierten Kontrollproben angegeben, die auf 100% gesetzt wurden.

3.2.9. Real-Time PCR (LightCycler-PCR)

Die LightCycler-PCR wurde vor kurzem als eine weitere Methode zur exakten DNA- und mRNA-Quantifizierung entwickelt (Wittwer et al., 1997). Sie verbindet DNA-Amplifizierung und direkte (real-time) Detektion der PCR-Produkte und ermöglicht auch bei niedrig exprimierten Genen bzw. bei wenig Ausgangsmaterial eine schnelle und gut reproduzierbare Quantifizierung der Zielgene. Die Quantifizierung basiert auf externen Standards bekannter Konzentration, die in jeder PCR parallel und unter gleichen Bedingungen mit den cDNA-Proben amplifiziert werden.

Als externe Standards wurden die in pGEM-Plasmidvektoren klonierten cDNA-Fragmente von β -Aktin (β -Aktin(2)), IA-2 und Insulin-1 der Ratte verwendet (siehe 3.2.6.3.). Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdau mit Apa I, Pst I bzw. Eco R I linearisiert und mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) gereinigt und in 100 μ l Elutionspuffer reeluiert (siehe 3.2.6.2.). Die DNA-Konzentration der Plasmide wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Kopienzahl (Zahl der Moleküle) von β -Aktin, IA-2 und Insulin-1 nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{DNA-Konzentration [g}/\mu\text{l}] \times 6 \times 10^{23}}{\text{Anzahl der Basenpaare} \times 660 \text{ g/mol}}$$

Die Expression der IA-2- und Insulin-cDNA wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR mit dem FastStart DNA SYBRGreen I Kit (Roche) im LightCycler-System analysiert. Die PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren (Roche) durchgeführt, die in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l je 2 μ l Fast Start DNA SYBRGreen I Mix, 3 mmol/l Magnesiumchlorid, 0,5 μ mol/l 5'- und 3'-Primer und 2 μ l Standard bzw. cDNA-Probe enthielten. Die DNA wurde im LightCycler

nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert: initiale Denaturierung der DNA und Aktivierung der *Taq* DNA-Polymerase für 10 min bei 95°C, zyklische Wiederholung von 1) Denaturierung für 15 sec bei 95°C, 2) Primer-Hybridisierung für 5 sec bei einer Primer-spezifischen Temperatur und 3) Elongation für 10 sec bei 72°C (Primersequenzen und Annealing-temperaturen: siehe Tabelle 3) für 40 Zyklen.

cDNA-Fragment	Primersequenz (A: 5'-Primer, B: 3'-Primer)	Produktlänge [Bp]	Annealing- temperatur [°C]
β-Aktin	A: ACCCACA CTGTGCCCATCTA B: GCCACAGGATTCCATACCCA	342	58
IA-2	A: TGCGCTCATTGCTGCTTACTCTG B: GGCGCTCCTTATCCCGTTGTTT	114	63
Insulin-1	A: ACCCAAGTCCCGTCGTGAAGT B: CCAGTTGGTAGAGGGAGCAGATG	164	61

Tabelle 3: Primersequenzen und Annealingtemperaturen für die LightCycler RT-PCR von β-Aktin, IA-2 und Insulin-1

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden am Ende jedes Zyklus durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm detektiert. Die für die Quantifizierung der cDNA-Proben benötigten Standardkurven wurden durch serielle Verdünnung der Standards generiert, wobei für jeden Standard vier Verdünnungen in den folgenden Bereichen pipettiert wurden:

β-Aktin: 1×10^4 bis 1×10^7 Kopien,
 IA-2: 1×10^3 bis 1×10^6 Kopien und
 Insulin-1: 1×10^5 bis 1×10^8 Kopien.

Die durch die LightCycler-PCR erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden durch die LightCycler Analysis Software mittels des Fit Point Algorithmus analysiert. Die Standardkurven wurden berechnet, indem die "crossing points" der Standards gegen den Logarithmus ihrer Konzentration aufgetragen wurden. Die "crossing points" stellen den Schnittpunkt der PCR-Amplifizierungskurve mit der Background-Linie dar und definieren die Zyklus-Nummer, bei der die Amplifizierung in die exponentielle Phase eintritt. Aus den Standardkurven wurden die Kopienzahlen der cDNA-Proben interpoliert. Das konstitutiv exprimierte "housekeeping"-Gen β-Aktin wurde genutzt, um die Proben auf gleiche cDNA-Mengen zu normalisieren. Die relativen Änderungen der Expression von IA-2 und Insulin in den stimulierten Proben wurden

in Prozent der basalen Werte der unstimulierten Kontrollproben angegeben, die auf 100% gesetzt wurden.

Nach jeder PCR wurde eine Schmelzpunkt-Analyse durchgeführt, um die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte zu bestätigen. Dazu wurde die Temperatur in den Glas-kapillaren langsam von 75°C auf 95°C erhöht, wobei die Fluoreszenzintensität kontinuierlich gemessen wurde. Dies ermöglicht die Bestimmung akkurater Schmelztemperaturen für jedes amplifizierte Produkt. Zusätzlich wurden einige ausgewählte PCR-Reaktionen auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und die PCR-Produkte durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

3.2.10. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde für jede Gruppe von Versuchsergebnissen der Mittelwert (\bar{X}) und die Standardabweichung des Mittelwertes (S.E.M.) ermittelt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels des gepaarten, Student's t-Test bestimmt. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant betrachtet. Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm Prism 3.0 (GraphPad Software; San Diego, CA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Nachweismethoden für IA-2

4.1.1. Nachweis der IA-2 Expression in INS-1 Zellen und primären Ratten-Inseln

Da primäre Inselzellen nur in eingeschränktem Maße zur Verfügung standen, sollte für den ersten Teil der Versuche zur Regulation der Genexpression von IA-2 eine Insulinoma-Zelllinie (Betazelllinie) als Modell verwendet werden. Die aus einem Ratten-Betazelltumor etablierte INS-1 Zell-Linie (Asfari et al., 1992) wurde als Modell ausgewählt, weil sie eine sehr hohe Ähnlichkeit mit ihrem parentalen, in vivo propagierten Tumor aufweist. INS-1 Zellen sind sensitiv für positive und negative Modulatoren der Insulin-Sekretion (Asfari et al, 1992) und für proinflammatorische Zytokine (Hohmeier et al., 1998). Sie stellen daher ein gutes Modell für die Untersuchung verschiedener Aspekte der Betazell-Funktion dar.

Die Expression der IA-2 mRNA war in INS-1 Zellen, die 3 Tage unter basalen Bedingungen kultiviert wurden, mittels Northern Blot und RT-PCR nachweisbar (siehe Abb.8).

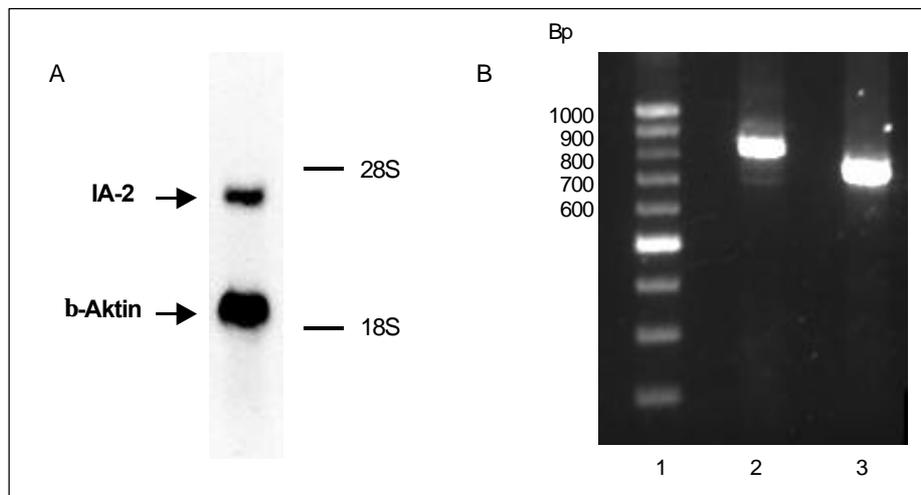


Abb. 8: Nachweis von IA-2 und des zur Normalisierung verwendeten "housekeeping"-Gens β -Aktin in INS-1 Zellen durch Northern Blot Analyse (A) und RT-PCR (B).

Im Northern Blot (A) wurde zusätzlich die Lage der 18S- und 28S- rRNA-Banden angegeben. Die Reaktionsansätze der RT-PCR wurden auf einem 2%-igen Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (B): 1: Molekulargewichtsmarker, 2: RT-PCR auf ein 822 bp-Fragment von IA-2, 3: RT-PCR auf ein 759 bp-Fragment von β -Aktin

Um IA-2 mittels Northern Blot in primären Langerhans'schen Inseln von Ratten zu detektieren, konnte nicht genügend RNA isoliert werden. Mit RT-PCR war die Expression der IA-2 mRNA auch in den primären Inseln gut nachweisbar.

4.1.2. Etablierung der kompetitiven RT-PCR

Für die kompetitive RT-PCR wurden Kompetitorfragmente generiert, die als interne Standards für die Quantifizierung der cDNA-Proben eingesetzt wurden. Das IA-2 und das β -Aktin Kompetitorfragment wurden durch interne Deletion von 100 bzw. 144 Basenpaaren aus den originalen, klonierten PCR-Fragmenten erzeugt. Die Kompetitorfragmente unterscheiden sich somit nur in der Länge von dem in der Zelle exprimierten IA-2 bzw. β -Aktin und werden bei der PCR mit gleicher Effizienz wie die originalen Fragmente koamplifiziert. Abbildung 9 zeigt anhand von zwei repräsentativen PCR-Reaktionen das Prinzip der Koamplifizierung von internem Standard und cDNA bei der kompetitiven IA-2- und β -Aktin- RT-PCR.

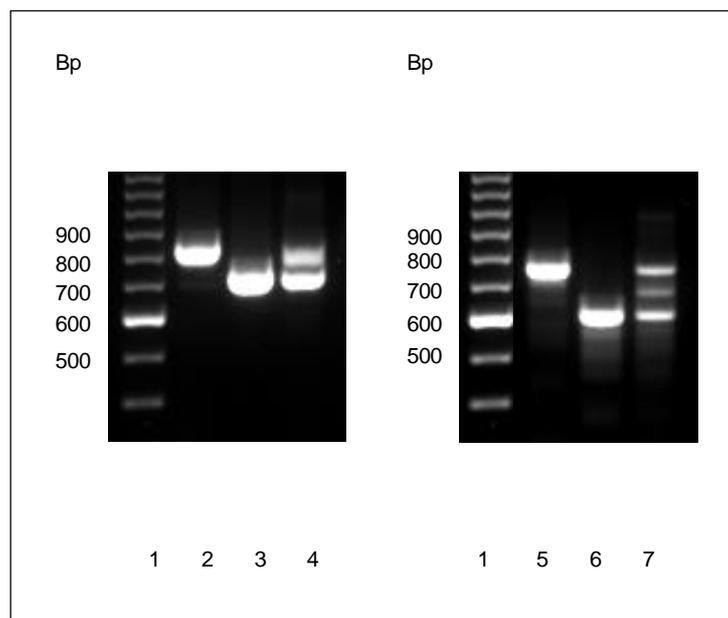


Abb. 9: Prinzip der kompetitiven RT-PCR auf IA-2 (2-4) und β -Aktin (5-7).

Die Reaktionsansätze der RT-PCR wurden auf einem 2%-igen Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt:

1: Molekulargewichtsmarker, 2: RT-PCR auf IA-2 mit cDNA aus INS-1 Zellen, 3: PCR auf IA-2 mit kloniertem IA-2-Kompetitorfragment, 4: kompetitive RT-PCR auf IA-2 mit cDNA aus INS-1 Zellen und zusätzlichem IA-2-Kompetitorfragment.

5: RT-PCR auf β -Aktin mit cDNA aus INS-1 Zellen, 6: PCR auf β -Aktin mit kloniertem β -Aktin-Kompetitorfragment, 7: kompetitive RT-PCR auf β -Aktin mit cDNA aus INS-1 Zellen und zusätzlichem β -Aktin-Kompetitorfragment.

In Optimierungsexperimenten wurde die optimale Zyklenzahl, bei der die PCR-Produkte in der exponentiellen Phase detektiert werden können, bestimmt. Dabei wurde für die PCR auf β -Aktin 27 Zyklen und für die PCR auf IA-2 29 Zyklen als Optimum gefunden.

4.1.3. Etablierung der real-time RT-PCR (LightCycler RT-PCR)

Die Quantifizierung der Kopienzahlen von cDNA-Proben mittels LightCycler RT-PCR beruht auf einer kontinuierlichen real-time Detektion der Amplifizierungsprodukte in der exponentiellen (logarithmisch-linearen) Phase der PCR. Für die LightCycler RT-PCR wurden Fragmente von IA-2, Insulin und β -Aktin kloniert, die als externe Standards in jeder PCR zusätzlich zu den cDNA-Proben eingesetzt wurden. In initialen Experimenten wurde zunächst für jede der drei PCRs die optimale Magnesiumchlorid-Konzentration bestimmt. Dazu wurden pro PCR-Ansatz unter gleichen Bedingungen je 1×10^6 Kopien (Moleküle) des klonierten Standardfragments amplifiziert, wobei Magnesiumchlorid in unterschiedlicher Menge von 1 mmol/l bis 5 mmol/l Endkonzentration zugesetzt wurde. Die auf diese Weise ermittelte optimale Magnesiumchlorid-Konzentration, bei der ein maximaler Anstieg des amplifizierten PCR-Produkts in der exponentiellen PCR-Phase zu beobachten ist, betrug für alle drei PCRs 3 mmol/l und wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

Die Kopienzahl der cDNA-Proben wurde aus Standardkurven extrapoliert, die in jeder PCR aus 4 Standards über einen Bereich von 1000 Kopien erstellt wurden. Der berechnete Irrtum innerhalb der Standardkurven, der ein Maß für die Genauigkeit des Pipettierens darstellt, war dabei immer < 0.1 . Die Effizienz der PCR in der exponentiellen Phase, die sich aus der Formel $\text{Effizienz} = 10^{-1/\text{Anstieg der Standardkurve}}$ berechnen lässt, lag immer zwischen 1.8 und 1.95, und war damit nur geringfügig kleiner als die theoretische PCR-Effizienz. Die theoretische PCR-Effizienz in der exponentiellen Phase ist 2.0 und korrespondiert mit einer Verdoppelung der Kopienzahl in jedem PCR-Zyklus während der exponentiellen Phase der PCR.

Zusätzlich zur Durchführung der PCR erlaubt der LightCycler die Bestimmung der Schmelzpunkte der amplifizierten PCR-Produkte. Die Analyse der Schmelzkurven aller PCR-Produkte nach jeder PCR demonstrierte die Spezifität der amplifizierten PCR-Fragmente, wobei folgende Schmelzpunkte erhalten wurden:

β -Aktin-Fragment: 89°C

IA-2-Fragment: 88°C

Insulin-Fragment: 90°C.

Die Abbildungen 10, 11 und 12 illustrieren die Fluoreszenzkurven (A) der Standards, der Wasserkontrolle und einer cDNA aus je einer repräsentativen LightCycler RT-PCR für β -Aktin, IA-2 und Insulin sowie die korrespondierenden Schmelzkurven (B) der amplifizierten PCR-Produkte.

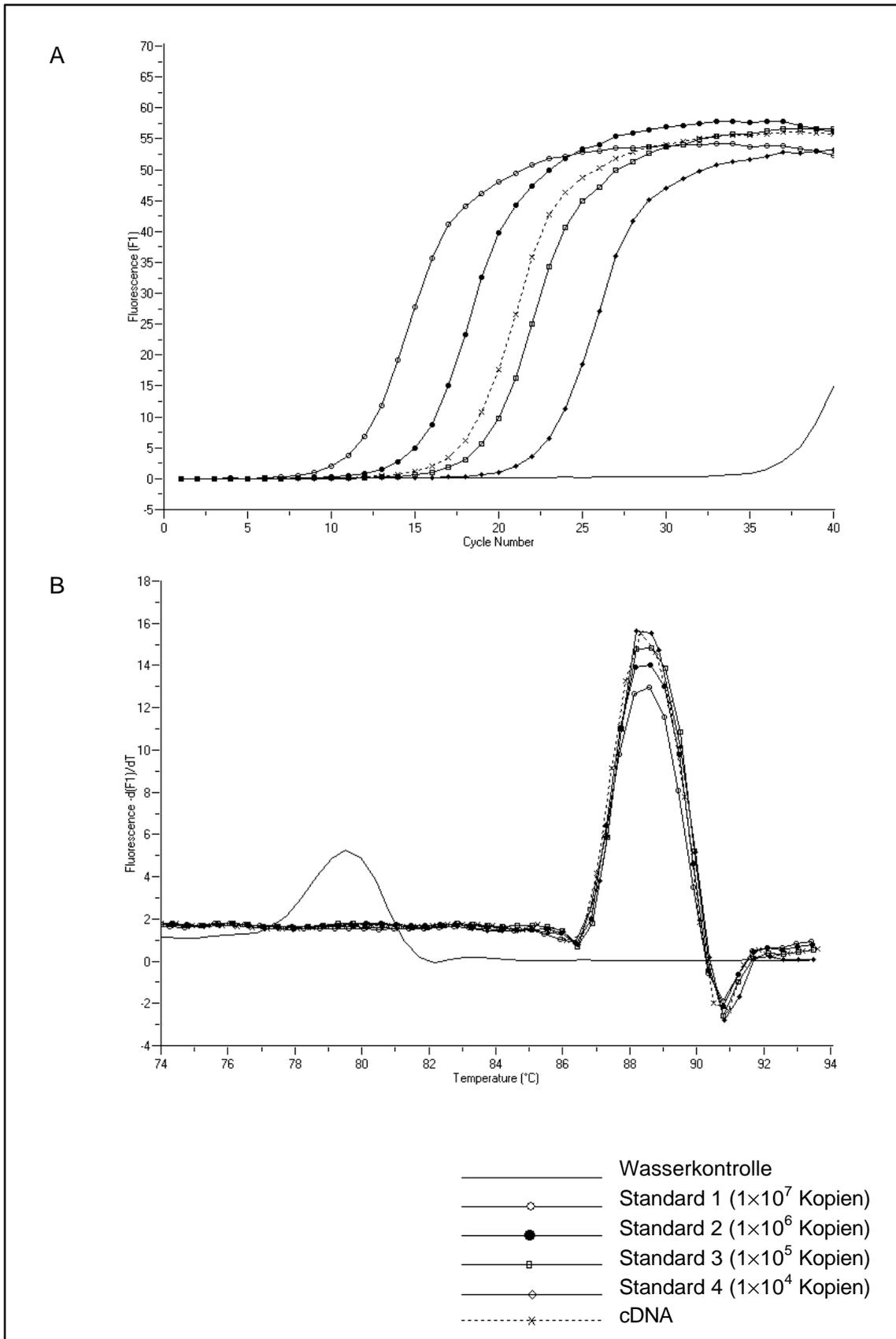


Abb. 10: Fluoreszenzdaten für die Quantifizierung (A) und die Schmelzkurven-Analyse der PCR-Produkte (B) einer repräsentativen LightCycler RT-PCR für β -Aktin

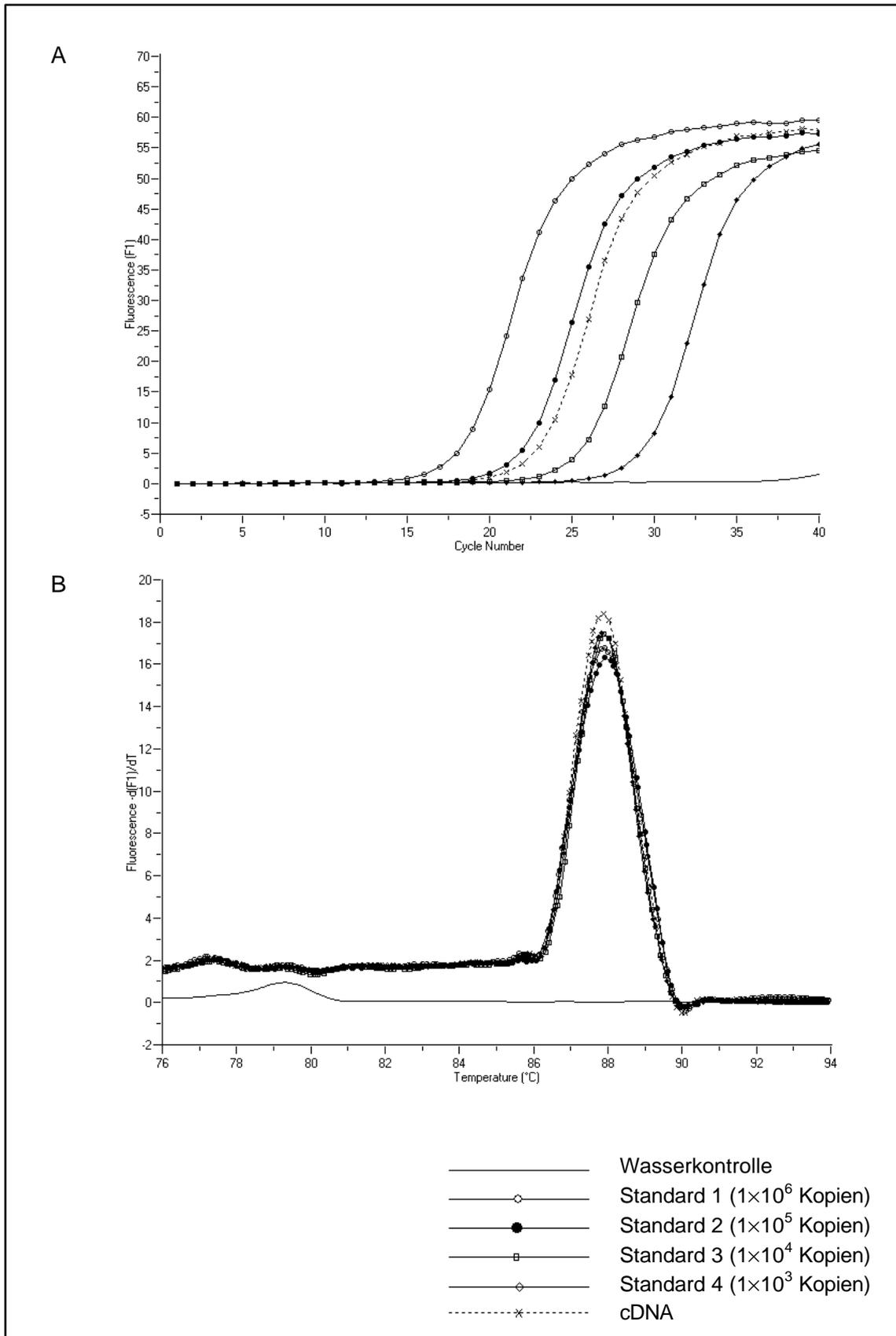


Abb. 11: Fluoreszenzdaten für die Quantifizierung (A) und die Schmelzkurven-Analyse der PCR-Produkte (B) einer repräsentativen LightCycler RT-PCR für IA-2

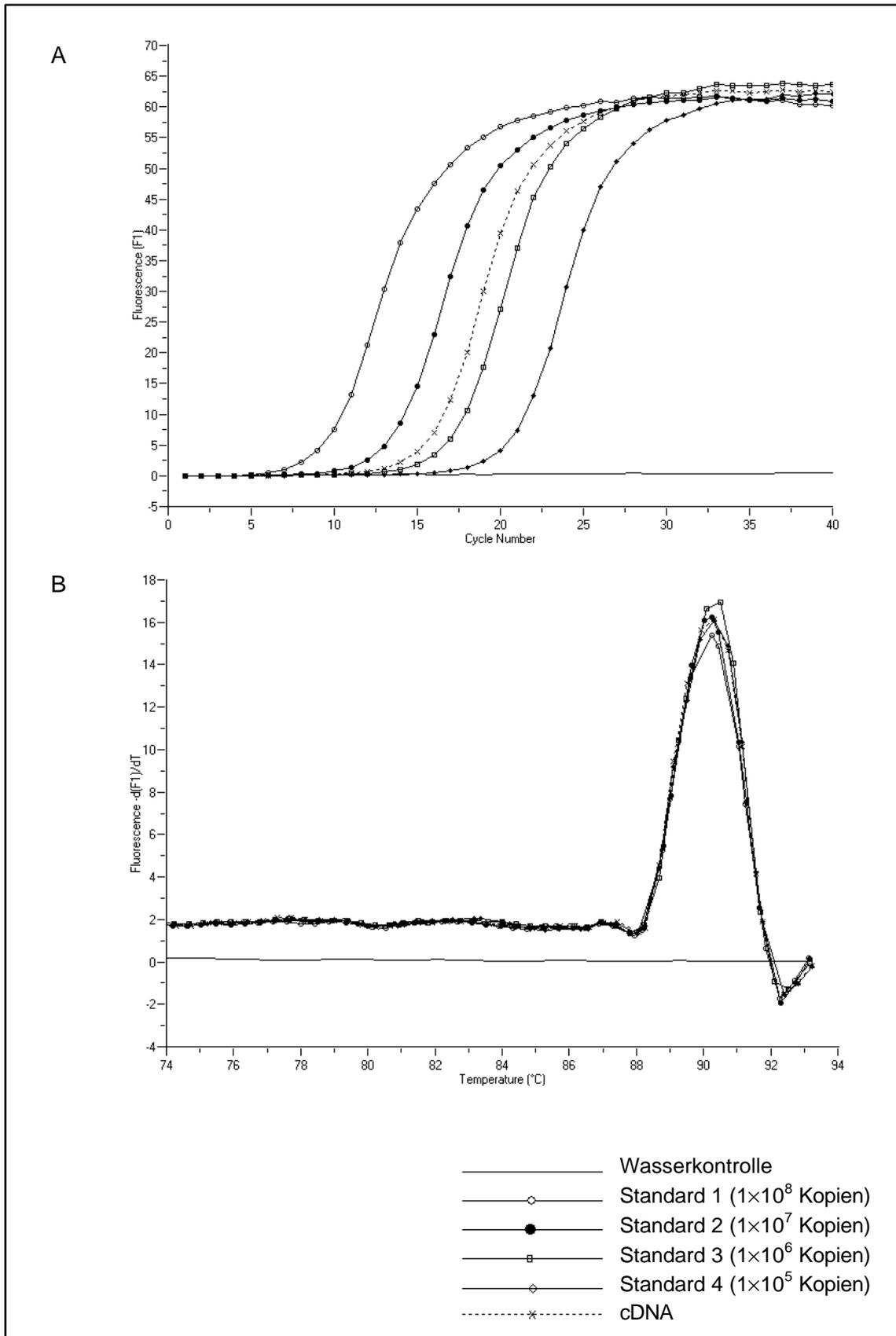


Abb. 12: Fluoreszenzdaten für die Quantifizierung (A) und die Schmelzkurven-Analyse der PCR-Produkte (B) einer repräsentativen LightCycler RT-PCR für Insulin

Zusätzlich wurden die Reaktionsansätze einiger ausgewählter RT-PCRs auf einem 2%igem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel aufgetragen, wobei die Länge der PCR-Produkte mit den berechneten Molekulargewichten der PCR-Fragmente (β -Aktin: 342 Bp, IA-2: 114 Bp und Insulin: 164 Bp) übereinstimmte und keine zusätzlichen unspezifischen PCR-Produkte detektiert wurden (siehe Abbildung 13).

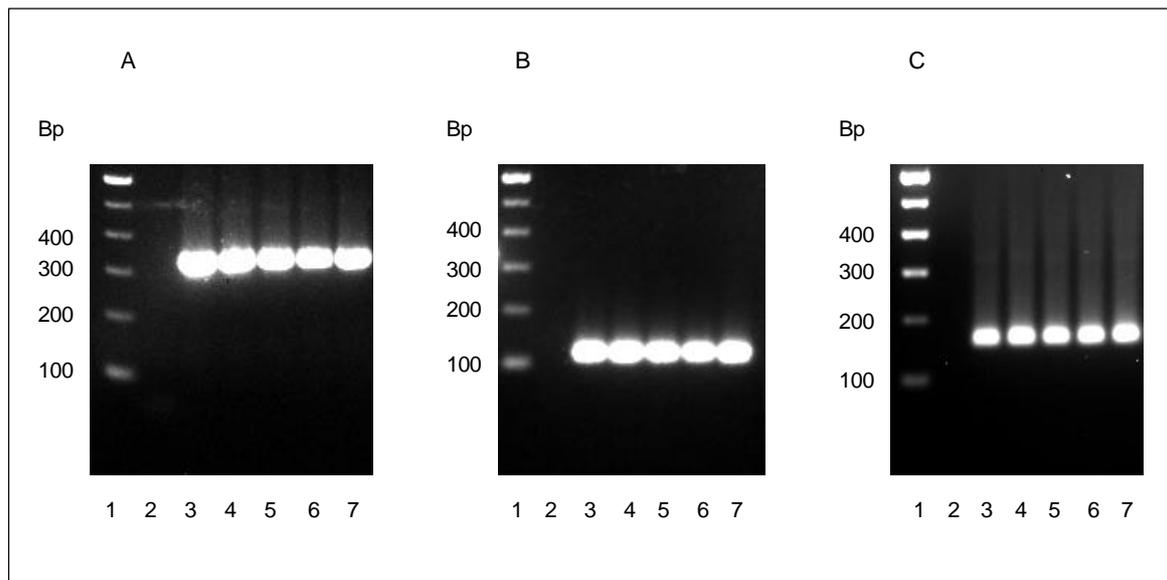


Abb. 13: Analyse von Reaktionsansätzen repräsentativer LightCycler-PCRs nach Gelelektrophorese auf einem 2% Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung (A: β -Aktin, B: IA-2, C: Insulin; 1: 100 Bp Molekulargewichtsmarker, 2: Wasserkontrolle, 3-6: Standards, 7: cDNA)

Die Reproduzierbarkeit der LightCycler RT-PCR wurde durch fünfmalige Wiederholungen derselben Probe in einer PCR an verschiedenen Tagen beurteilt. Tabelle 4 zeigt die intra- und inter-assay Variationskoeffizienten (VK) für identische Kopienzahlen von 5×10^4 Kopien von IA-2 bzw. Insulin. Um Beeinflussungen der Resultate durch inter-assay Variationen auszuschließen, wurden die Kopienzahlen von cDNA Proben aus basalen und stimulierten Zellen nur miteinander verglichen, wenn sie zusammen in einer PCR gelaufen waren.

Variationskoeffizienten (VK)	IA-2	Insulin
intra-assay VK der Kopienzahlen	9,7%	11,7%
intra-assay VK der "crossing points"	0,8%	1,4%
inter-assay VK der Kopienzahlen	18,3%	32,0%
inter-assay VK der "crossing points"	1,9%	1,4%

Tab. 4: Intra-Assay und Inter-Assay Variationskoeffizienten der IA-2- und Insulin-LightCycler RT-PCR

4.1.4. Vergleich von Northern Blot Analyse, kompetitiver RT-PCR und Real-Time RT-PCR

Änderungen in der Genexpression von IA-2 nach Stimulation der INS-1 Zell-Linie wurden mittels einer konventionellen Methode (Northern Blot Analyse) und zweier quantitativer RT-PCRs bestimmt. Stimulation bzw. Inhibition der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen konnte dabei mit allen drei verwendeten Methoden zuverlässig und reproduzierbar detektiert werden (siehe Abb.14, 15, 16 und 17).

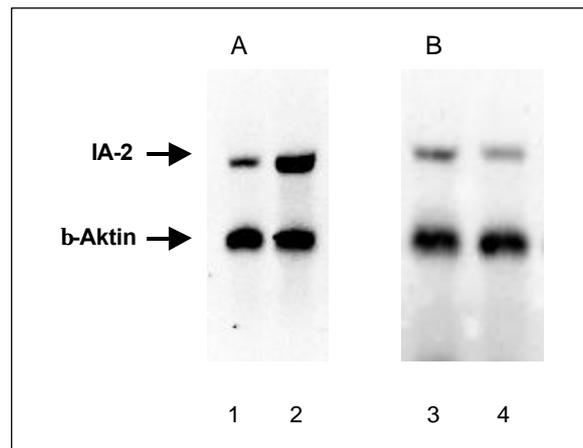


Abb. 14: Detektion der Stimulation von IA-2 mit Forskolin (A) und der Inhibition von IA-2 mit IL-1 β (B) durch Northern Blot Analyse.
(1: basal, 2: 24 h Stimulation mit 10 μ mol/l Forskolin; 3: basal, 4: 24h Stimulation mit 50 U/ml IL-1 β)

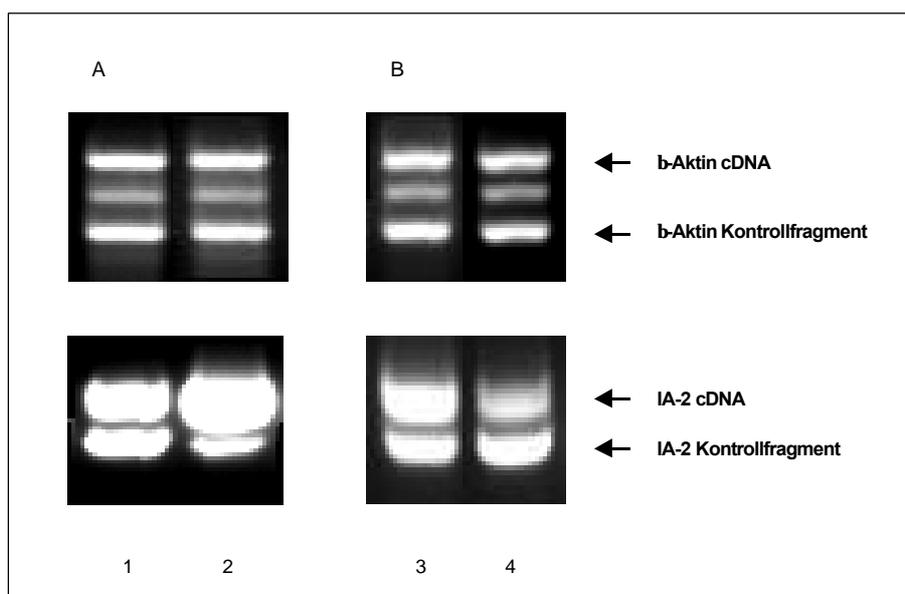


Abb. 15: Detektion der Stimulation von IA-2 mit Forskolin (A) und der Inhibition von IA-2 mit IL-1 β (B) durch kompetitive RT-PCR.
(1: basal, 2: 24 h Stimulation mit 10 μ mol/l Forskolin; 3: basal, 4: 24h Stimulation mit 50 U/ml IL-1 β)

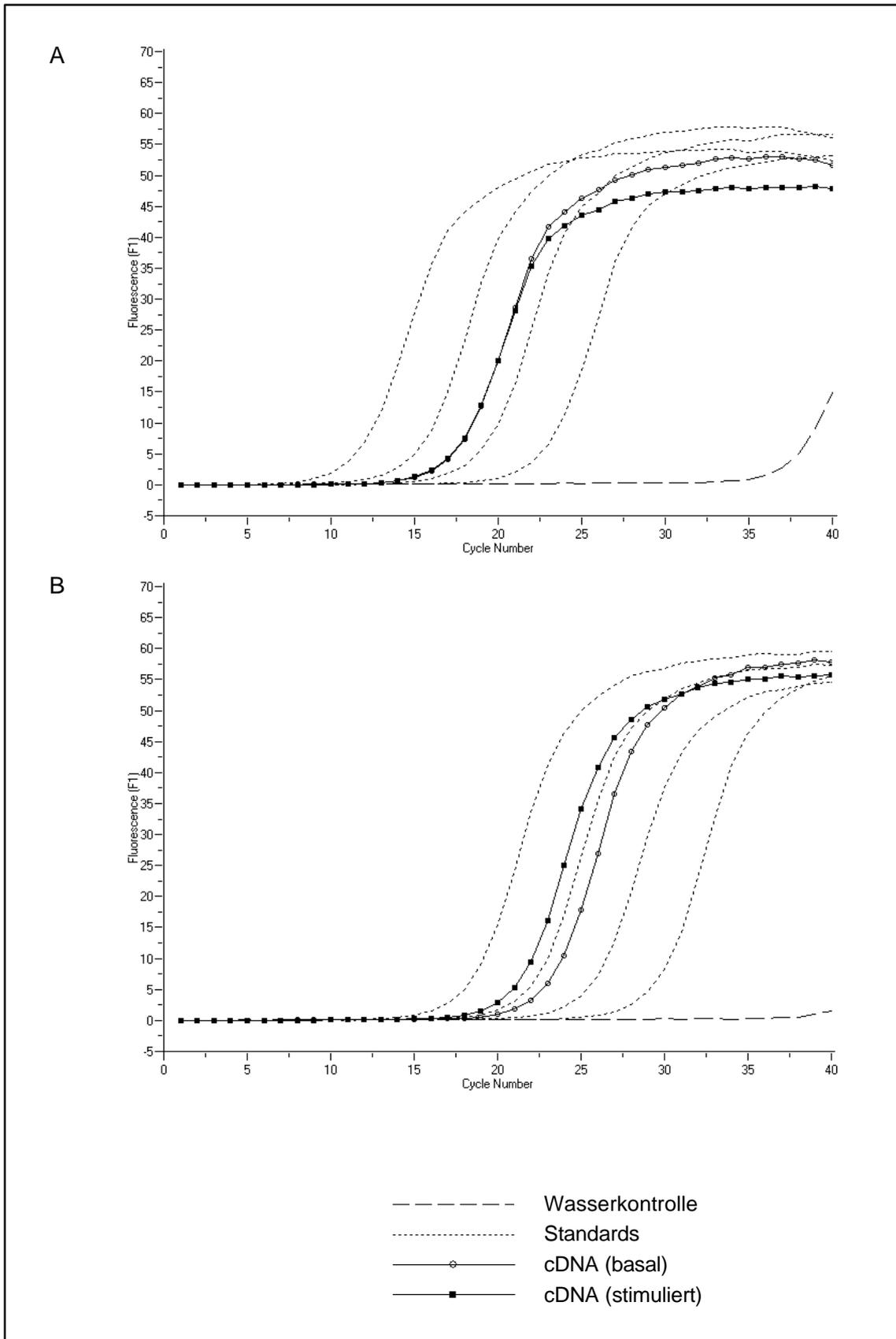


Abb. 16: Detektion der Stimulation von IA-2 mit Forskolin durch LightCycler RT-PCR. Die INS-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 µmol/l Forskolin stimuliert. (A: β-Aktin, B: IA-2)

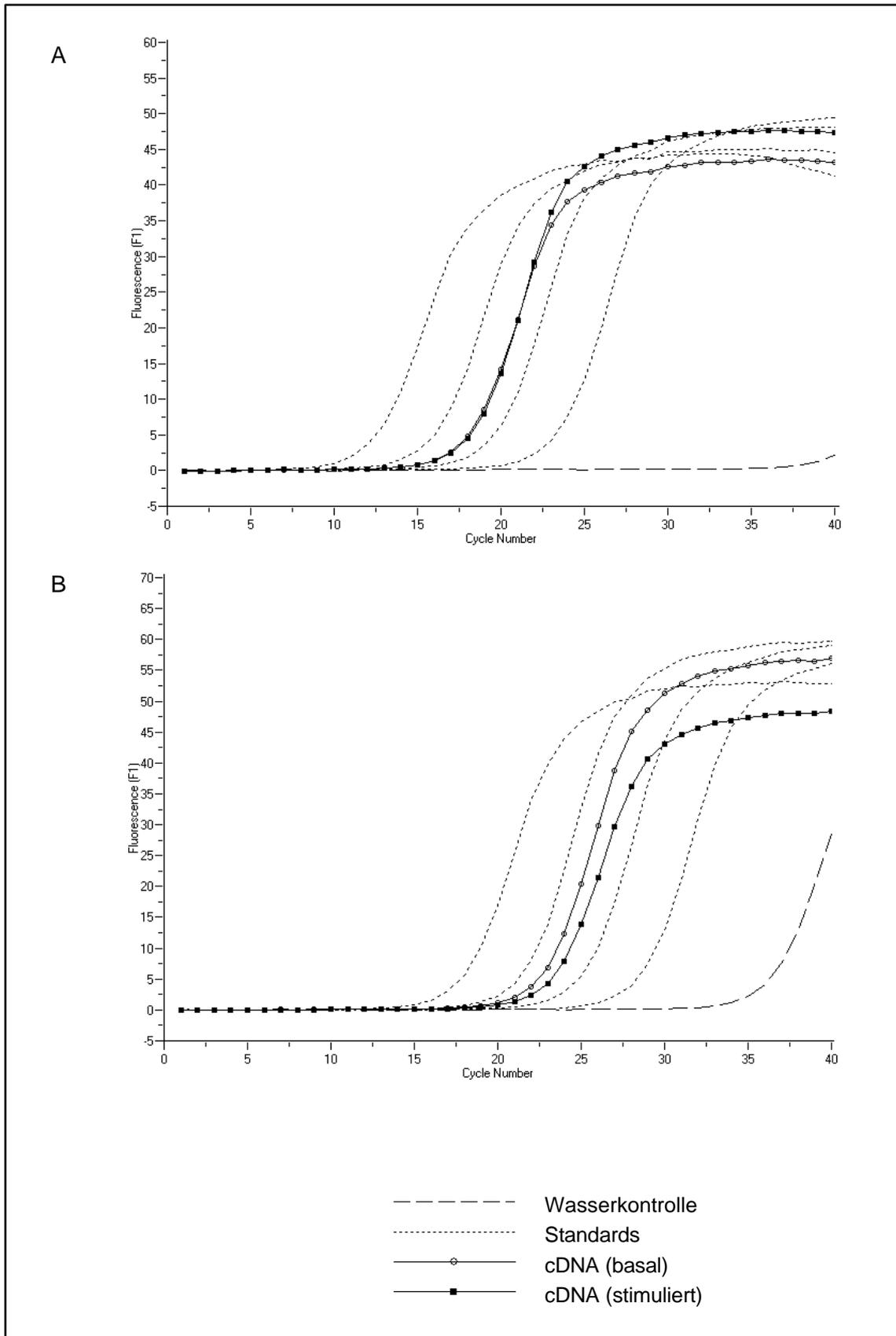


Abb. 17: Detektion der Inhibition von IA-2 mit IL-1 β durch LightCycler RT-PCR. Die INS-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 U/ml IL-1 β stimuliert. (A: β -Aktin, B: IA-2)

Die Tendenz in den berechneten Stimulationsindices für eine repräsentative Stimulation von IA-2 mit Forskolin und eine Inhibition mit IL-1 β war bei den drei verwendeten Methoden vergleichbar:

Methode	Stimulationsindex: Forskolin	Stimulationsindex: IL-1 β
Northern Blot Analyse	518%	71%
kompetitive RT-PCR	490%	57%
LightCycler RT-PCR	308,4% \pm 38,5%	60,5% \pm 8,1%

Tab. 5: Vergleich der durch unterschiedliche Methoden ermittelten IA-2-Stimulationsindices nach 24-stündiger Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit 10 μ mol/l Forskolin bzw. 50 U/ml IL-1 β

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse wurden mittels der LightCycler RT-PCR erstellt, weil diese Methode eine präzise, gut reproduzierbare Quantifizierung der mRNA-Expression von IA-2 bei im Vergleich zu Northern Blot Analyse und kompetitiver RT-PCR geringerem Arbeits- und Zeitaufwand lieferte. Zusätzlich wurde noch eine LightCycler RT-PCR für Insulin etabliert, um die mRNA-Expression beider Autoantigene miteinander vergleichen zu können. Eine zuverlässige Quantifizierung der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in primären Langerhans'schen Inseln der Ratte war nur mit der Methode der LightCycler-PCR möglich.

Mittels LightCycler konnten auch die Kopienzahlen von IA-2 und Insulin bestimmt werden. Unter basalen Bedingungen betragen in INS-1 Zellen die mRNA-Konzentrationen für IA-2 und Insulin $2,2 \pm 0,2 \times 10^4$ Kopien bzw. $12,9 \pm 1,7 \times 10^5$ Kopien pro 1×10^5 Kopien β -Aktin. In primären Inseln waren die mRNA-Konzentrationen für IA-2 und Insulin $0,9 \pm 0,2 \times 10^4$ Kopien bzw. $233,4 \pm 48,8 \times 10^5$ Kopien pro 1×10^5 Kopien β -Aktin. Diese Bestimmung der Kopienzahlen erlaubt einen direkten Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit Ergebnissen aus eventuellen späteren Studien.

4.2. Einfluss von metabolischen und hormonellen Faktoren auf die Expression von IA-2 und Insulin

4.2.1. Einfluss von Glucose auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen

D-Glucose ist der wichtigste metabolische Stimulus der Insulinsekretion in Betazellen. Die INS-1 Zell-Linie hat ebenfalls eine, wenn auch im Vergleich zu primären Betazellen, geringere Kapazität der Insulinsekretion nach Glucosestimulation (Asfari et al., 1992). Es wurde daher untersucht, ob eine erhöhte Glucosekonzentration auch die mRNA Expression von IA-2 und Insulin beeinflusst. Dazu wurde die INS-1 Zell-Linie über 6 Stunden, 24 Stunden und 6 Tage mit 10 mmol/l, 15 mmol/l und 21 mmol/l D-Glucose stimuliert. Die nach LightCycler RT-PCR ermittelten IA-2 und Insulin Stimulationsindices sind in Tab. 6 angegeben.

Glucose-konzentration	Stimulationsdauer	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
10 mmol/l	6 h	108.9% ± 18.5% (p>0,05; n.s.)	102.6% ± 17.8% (p>0,05; n.s.)
	24 h	88.5% ± 5.2% (p>0,05; n.s.)	67.7% ± 4.6% (p<0,05)
	6 d	141.4% ± 19.2% (p<0,05)	101.1% ± 16.7% (p>0,05; n.s.)
15 mmol/l	6 h	91.8% ± 10.4% (p>0,05; n.s.)	91.4% ± 1.0% (p>0,05; n.s.)
	24 h	94.7% ± 2.7% (p>0,05; n.s.)	42.6% ± 3.2% (p<0,01)
	6 d	200.9% ± 6.6% (p<0,01)	45.0% ± 6.2% (p<0,01)
21 mmol/l	6 h	108.0% ± 22.4% (p>0,05; n.s.)	94.3% ± 6.5% (p>0,05; n.s.)
	24 h	88.0% ± 2.8% (p>0,05; n.s.)	26.1% ± 2.4% (p<0,01)
	6 d	223.5% ± 7.3% (p<0,01)	21.4% ± 1.5% (p<0,001)

Tab. 6: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 6 und 24 Stunden sowie 6 Tagen Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10, 15 und 21 mmol/l D-Glucose.
(Anzahl der Versuche: n = 3)

Eine kurze Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit erhöhten Glucosekonzentrationen für 6 Stunden hatte weder auf die mRNA Expression von IA-2 noch von Insulin einen Einfluss. Auch nach 24 Stunden Inkubation mit erhöhten Glucosekonzentrationen war die IA-2 Expression nicht signifikant verändert, während die Expression von Insulin dosisabhängig gehemmt wurde. Eine Langzeitstimulation der INS-1 Zell-Linie mit erhöhten Glucosekonzentrationen für 6 Tage stimulierte dagegen die Expression von IA-2 dosisabhängig,

während die Hemmung der Insulin Expression nicht weiter verstärkt war. Die maximale Stimulation der IA-2 Expression auf 223% wurde nach 6 Tagen Inkubation der INS-1 Zell-Linie bei 21 mmol/l Glucose beobachtet. Dabei war gleichzeitig die Expression von Insulin maximal auf 21% gehemmt (siehe Abb. 18).

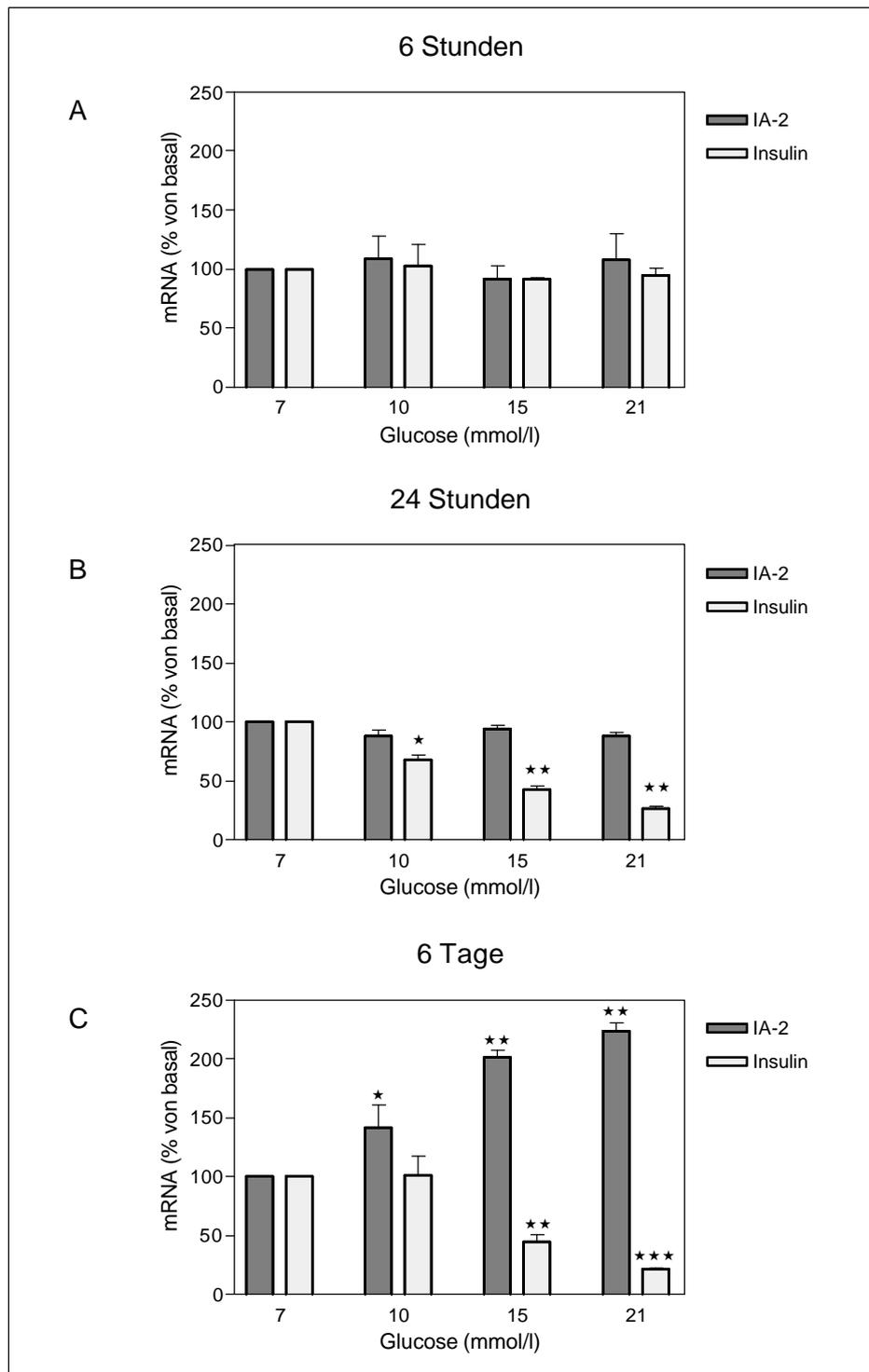


Abb. 18: D-Glucose stimuliert dosis- und zeitabhängig die mRNA Expression von IA-2 und inhibiert die mRNA Expression von Insulin in der INS-1 Zell-Linie.

(Anzahl der Versuche: n = 3; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Zusätzlich zum Einfluss von erhöhten Glucose-Konzentrationen auf die IA-2 und Insulin Genexpression wurde auch die Insulin-Sekretion der INS-1 Zellen untersucht. Der mittels RIA bestimmte Insulin-Gehalt im Kulturmedium der INS-1 Zellen ist in Tab. 7 angegeben.

Stimulationsdauer	Glucose-Konzentration	Insulingehalt im Kulturmedium
6 h	7 mmol/l (basal)	95,8 ng/ml \pm 11,0 ng/ml
	10 mmol/l	119,5 ng/ml \pm 15,8 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
	15 mmol/l	136,3 ng/ml \pm 2,4 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
	21 mmol/l	174,6 ng/ml \pm 33,2 ng/ml ($p < 0,05$)
24 h	7 mmol/l (basal)	264,8 ng/ml \pm 10,2 ng/ml
	10 mmol/l	263,3 ng/ml \pm 16,7 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
	15 mmol/l	280,3 ng/ml \pm 10,2 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
	21 mmol/l	286,1 ng/ml \pm 7,4 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
6 d	7 mmol/l (basal)	435,5 ng/ml \pm 11,8 ng/ml
	10 mmol/l	385,1 ng/ml \pm 129,3 ng/ml ($p > 0,05$; n.s.)
	15 mmol/l	106,6 ng/ml \pm 12,8 ng/ml ($p < 0,05$)
	21 mmol/l	40,0 ng/ml \pm 7,3 ng/ml ($p < 0,05$)

Tab. 7: Insulingehalt im Kulturmedium von INS-1 Zellen nach 6 und 24 Stunden sowie 6 Tagen Inkubation mit 7, 10, 15 und 21 mmol/l D-Glucose. Bei der 6-tägigen Stimulation wurde nach 3 Tagen bei allen Zellen das Medium gewechselt.

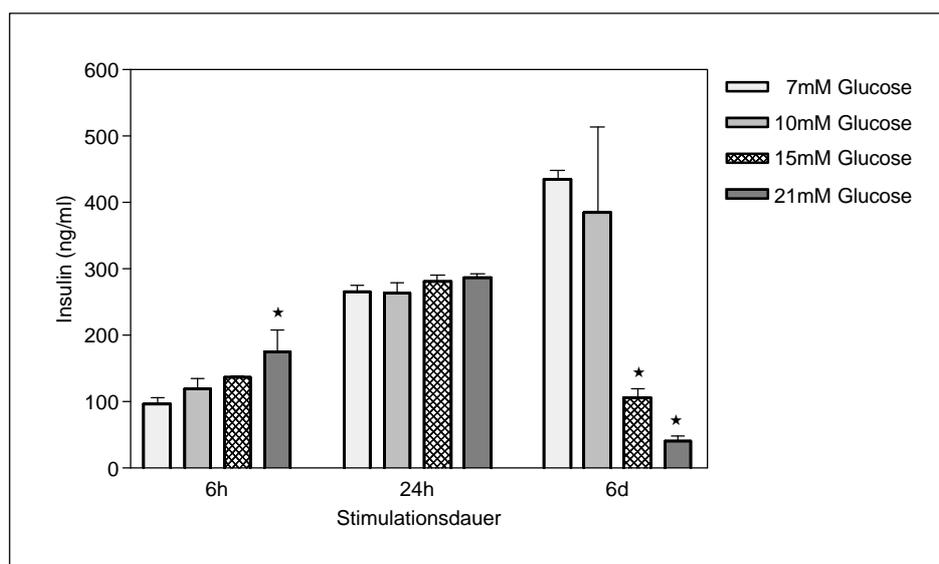


Abb. 19: D-Glucose stimuliert bei 6-stündiger Inkubation dosisabhängig die Insulinsekretion von INS-1 Zellen, während nach Langzeitstimulation (6 Tage) dosisabhängig die Insulin-Sekretion gehemmt wird.

(Anzahl der Versuche: $n = 3$; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

4.2.2. Die cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX stimulieren die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Expression von IA-2 durch eine von dem "second messenger" cAMP vermittelte Signaltransduktion reguliert wird, wurde die INS-1 Zell-Linie zunächst mit zwei synthetischen Stimulatoren des intrazytoplasmatischen cAMP-Gehalts inkubiert. Forskolin steigert die cAMP-Synthese durch Aktivierung der Adenylat-Cyclase, während 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) den Abbau des cAMPs durch Hemmung der Phosphodiesterase verlangsamt. Die INS-1 Zell-Linie wurde für 6, 24 und 48 Stunden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX inkubiert und die Änderungen in der IA-2 und Insulin mRNA-Expression durch LightCycler RT-PCR bestimmt (siehe Tab. 8).

Stimulans	Stimulationsdauer	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
Forskolin	6 h	263,9% \pm 29,4% (p<0,05)	117,8% \pm 5,5% (p>0,05; n.s.)
	24 h	308,4% \pm 38,5% (p<0,05)	188,0% \pm 10,1% (p<0,05)
	48 h	281,7% \pm 19,3% (p<0,05)	242,3% \pm 23,8% (p<0,05)
IBMX	6 h	176,3% \pm 12,3% (p<0,05)	123,5% \pm 17,9% (p>0,05; n.s.)
	24 h	246,3% \pm 5,3% (p<0,01)	171,6% \pm 18,7% (p<0,05)
	48 h	162,1% \pm 24,2% (p>0,05; n.s.)	148,0% \pm 22,2% (p>0,05; n.s.)

Tab. 8: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 6, 24 und 48 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX. (Anzahl der Versuche: n = 3)

Die mRNA-Expression von IA-2 wird durch eine Erhöhung des intrazytoplasmatischen Gehalts an cAMP in der INS-1 Zell-Linie hochreguliert. Die Abb. 20 zeigt, dass der Zeitverlauf der IA-2 Stimulation nach Inkubation mit Forskolin und IBMX gleich war: Die IA-2 mRNA wurde bereits nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit beiden synthetischen cAMP-Stimulatoren signifikant hochreguliert und erreichte eine maximale Expression nach 24 Stunden Stimulation. Die IA-2 Expression wurde nach 24 Stunden Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin maximal auf 308% und mit 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX auf 246% gesteigert. Eine Verlängerung der Stimulationsdauer auf 48 Stunden führte nicht zu einer weiteren Steigerung der IA-2 Expression. Gleichzeitig mit IA-2 wurde auch die Expression von Insulin durch Forskolin und IBMX gesteigert. Allerdings waren die Stimulationsindices der Insulin-Expression zu allen drei untersuchten Zeitpunkten geringer als bei IA-2. Eine maximale Stimulation der Insulin-Expression auf 242% wurde nach 48 Stunden Inkubation der Zellen

mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin beobachtet, während 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX die Insulin-Expression nach 24 Stunden Inkubation maximal auf 172% stimulierte.

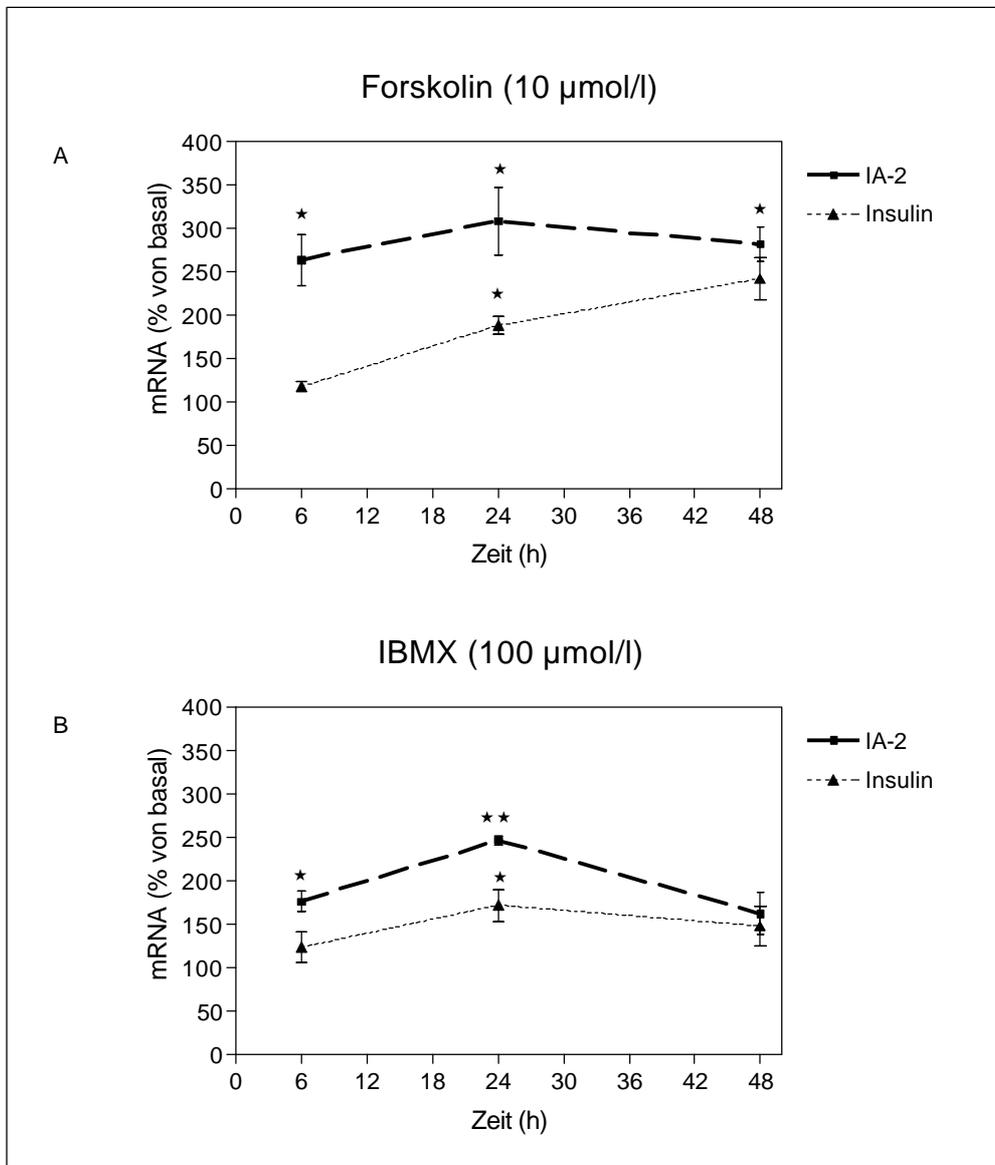


Abb. 20: Stimulation der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ IBMX.
(Anzahl der Versuche: $n = 3$; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Das nach 24 Stunden Stimulation mit Forskolin oder IBMX ins Medium sezernierte Insulin wurde mittels eines kommerziellen Radioimmunoassays für Ratten-Insulin (Rat Insulin RIA Kit, Linco) bestimmt (siehe Tab. 9).

Stimulans	Insulingehalt im INS-1 Kulturmedium
basal	314,5 ng/ml \pm 79,1 ng/ml
Forskolin	2072,0 ng/ml \pm 54,2 ng/ml ($p < 0,01$)
IBMX	650,5 ng/ml \pm 88,7 ng/ml ($p < 0,05$)

Tab. 9: Insulingehalt im Kulturmedium von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 10 μ mol/l Forskolin bzw. 100 μ mol/l IBMX im Vergleich zu basalen unstimulierten INS-1 Zellen. (Anzahl der Versuche: n = 3)

Neben der Stimulation der IA-2 und Insulin mRNA-Expression steigerten die cAMP-Stimulantien ebenfalls die Insulin-Sekretion der INS-1 Zell-Linie signifikant. Wie in Abb. 21 dargestellt ist, war nach 24 Stunden Inkubation mit Forskolin das ins Medium sezernierte Insulin auf 660% des basalen Wertes erhöht. Eine 24-stündige Stimulation mit IBMX bewirkte eine geringere, aber ebenfalls signifikante Steigerung der Insulinsekretion auf 210% des basalen Wertes.

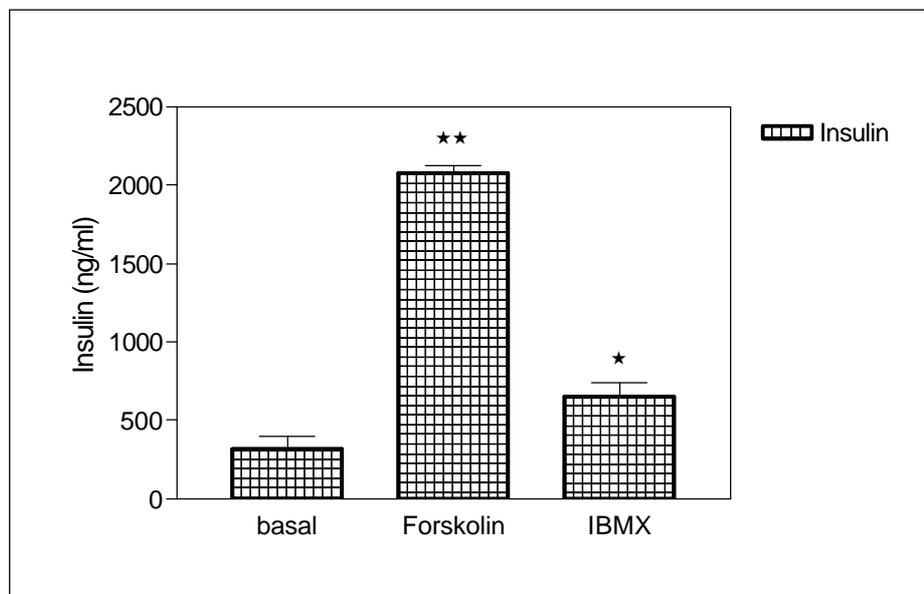


Abb.21: Stimulation der Insulinsekretion von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 10 μ mol/l Forskolin bzw. 100 μ mol/l IBMX. (Anzahl der Versuche: n = 3; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

4.2.3. Einfluss der cAMP-stimulierenden Hormone Glucagon und GLP-1 auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen

Glucagon, das Haupthormon der Alphazellen des endokrinen Pankreas und Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1), ein Inkretin-Hormon des Dünndarms, bewirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase, die nachfolgend zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in Betazellen führt. Es wurde daher untersucht, ob die von diesen beiden Hormonen induzierte Steigerung des cAMP-Gehalts ebenfalls zu einer Stimulation der IA-2 und Insulin Expression in der INS-1 Zell-Linie führt. Die durch LightCycler RT-PCR erhaltenen Stimulationsindices nach 24-stündiger Stimulation der INS-1 Zellen sind in Tab. 10 angegeben:

Hormon	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
Glucagon	233,4% ± 20,6% (p<0,05)	126,9% ± 14,5% (p>0,05; n.s.)
GLP-1	258,2% ± 35,4% (p<0,05)	164,6% ± 8,2% (p<0,05)

Tab. 10: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10 µmol/l Glucagon bzw. 1 nmol/l GLP-1.
(Anzahl der Versuche: n = 3)

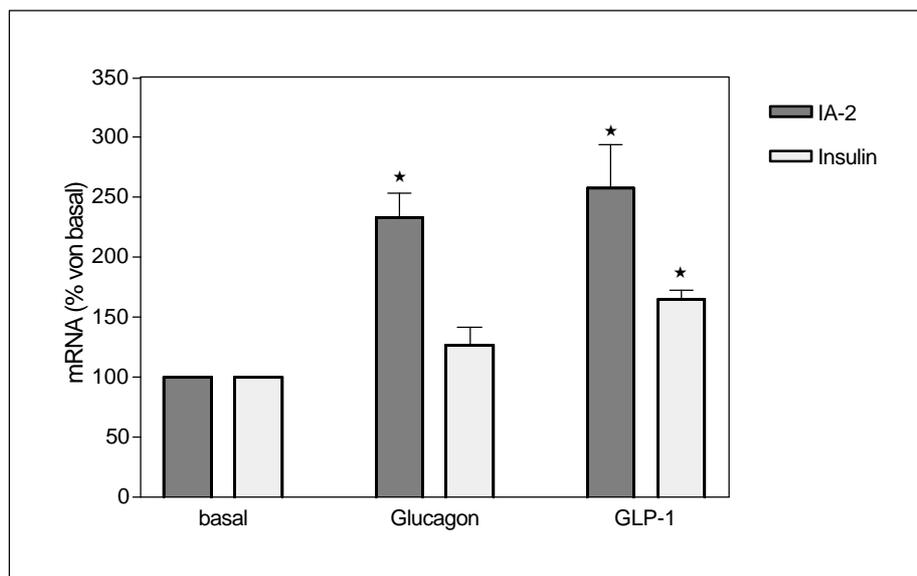


Abb. 22: Einfluss von Glucagon und GLP-1 auf die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin nach 24-stündiger Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit den Hormonen.
(Anzahl der Versuche: n = 3; *: p<0,05)

Wie in Abb. 22 dargestellt ist, steigerte eine 24-stündige Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit GLP-1 oder Glucagon sowohl die IA-2 als auch die Insulin mRNA Expression, wobei der durch GLP-1 induzierte Effekt stärker war. Mit 1 nmol/l GLP-1 war die IA-2 Expression signifikant auf 258% und die Insulin Expression ebenfalls signifikant auf 165% erhöht. Glucagon steigerte bei Verwendung höherer Konzentrationen (10 µmol/l) die IA-2 Expression fast ebenso stark wie GLP-1 auf 233%, während die Insulin Expression nur leicht und nicht signifikant auf 127% erhöht war.

Der Einfluss von Glucagon und GLP-1 auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen wurde ebenfalls untersucht. In Tab. 11 sind die Werte für das mittels RIA bestimmte, ins Kulturmedium sezernierte Insulin nach 24-stündiger Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit den beiden Hormonen angegeben.

Hormon	Insulingehalt im INS-1 Kulturmedium
basal	244,3 ng/ml ± 23,2 ng/ml
Glucagon	1114,0 ng/ml ± 36,9 ng/ml (p<0,05)
GLP-1	585,9 ng/ml ± 56,8 ng/ml (p<0,05)

Tab. 11: Insulingehalt im Kulturmedium von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 10 µmol/l Glucagon bzw. 1 nmol/l GLP-1 im Vergleich zu unstimulierten INS-1 Zellen.
(Anzahl der Versuche: n = 3)

Sowohl Glucagon als auch GLP-1 steigerten die Insulin-Sekretion der INS-1 Zell-Linie signifikant. Nach 24-stündiger Stimulation mit Glucagon war das ins Kulturmedium sezernierte Insulin auf 460% des basalen Wertes erhöht, während GLP-1 die Insulinsekretion auf 240% des basalen Wertes steigerte (siehe Abb. 23).

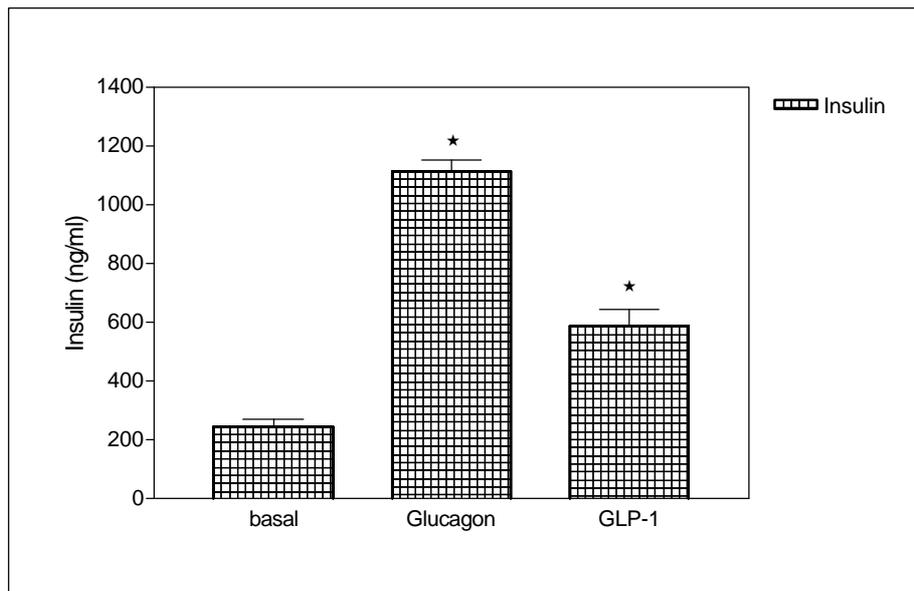


Abb.23: Stimulation der Insulinsekretion von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon bzw. 1 nmol/l GLP-1.
(Anzahl der Versuche: $n = 3$; *: $p < 0,05$)

Für das Inkretin-Hormon GLP-1, das die stärksten Effekte bewirkt hatte, wurde der Einfluss der Dosis und der Stimulationsdauer auf die Stimulation der IA-2 und Insulin mRNA Expression untersucht. Dazu wurde die INS-1 Zell-Linie zunächst für 24 Stunden mit GLP-1 in Konzentrationen von 0,1 nmol/l bis 2 nmol/l und danach mit 1 nmol/l GLP-1 für 6, 24 und 48 Stunden inkubiert. Die nach LightCycler RT-PCR ermittelten IA-2 und Insulin Stimulationsindices sind in Tab.12 und Tab.13 angegeben.

Hormon	Konzentration	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
GLP-1	0,1 nmol/l	224,7% \pm 1,9% ($p < 0,05$)	162,3% \pm 14,1% ($p > 0,05$; n.s.)
	0,5 nmol/l	248,3% \pm 6,8% ($p < 0,05$)	179,2% \pm 9,8% ($p < 0,05$)
	1 nmol/l	258,2% \pm 35,4% ($p < 0,05$)	164,6% \pm 8,2% ($p < 0,05$)
	2 nmol/l	158,5% \pm 18,0% ($p > 0,05$; n.s.)	109,1% \pm 3,4% ($p > 0,05$; n.s.)

Tab.12: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit verschiedenen Konzentrationen von GLP-1.
(Anzahl der Versuche: $n = 2-3$)
Die hervorgehobene GLP-1-Konzentration (1 nmol/l) wurde für die nachfolgende Bestimmung der Zeitabhängigkeit der GLP-1-induzierten Stimulation verwendet.

Hormon	Stimulationsdauer	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
GLP-1	6 h	187,1% ± 24,0% (p<0,05)	125,3% ± 21,7% (p>0,05; n.s.)
	24 h	258,2% ± 35,4% (p<0,05)	164,6% ± 8,2% (p<0,05)
	48 h	99,9% ± 2,5% (p>0,05; n.s.)	123,8% ± 9,3% (p>0,05; n.s.)

Tab.13: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 6, 24 und 48 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 1 nmol/l GLP-1.
(Anzahl der Versuche: n = 3)

Abb. 24 zeigt, dass GLP-1 die IA-2 Expression am stärksten bei einer Konzentration von 1 nmol/l stimulierte (auf 258%). Diese Konzentration wurde daher auch für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der GLP-1-induzierten Stimulation eingesetzt. Der Zeitverlauf der Stimulation war wie bei Inkubation mit Forskolin und IBMX dadurch gekennzeichnet, dass die IA-2 und Insulin Expression bereits nach 6-stündiger Inkubation leicht erhöht war und nach 24 Stunden den Maximalwert erreichte, während bei einer auf 48 Stunden verlängerten Inkubation die IA-2 und Insulin Expression wieder zurückging.

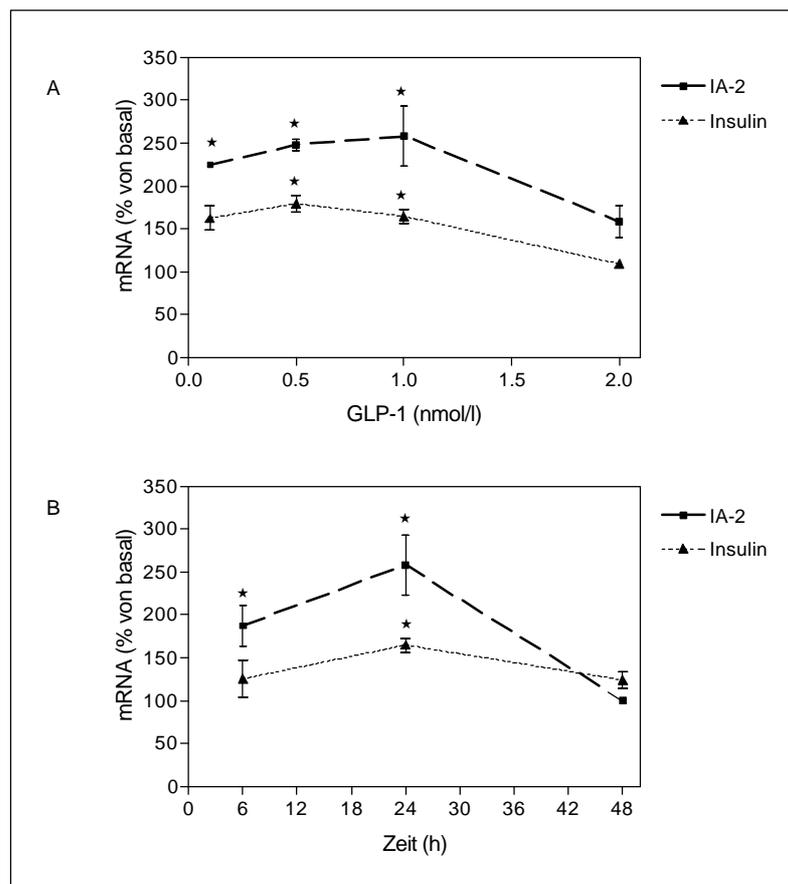


Abb. 24: Abhängigkeit der GLP-1-induzierten IA-2 und Insulin Stimulation in der INS-1 Zell-Linie von der GLP-1 Dosis (A) und der Zeitdauer der Stimulation (B)
(Anzahl der Versuche: n = 3; *: p<0,05)

Um die Beteiligung von cAMP an der Stimulation der IA-2 mRNA-Expression näher zu untersuchen, wurden die INS-1 Zellen außerdem für 24 Stunden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon und dem cAMP-Antagonisten Rp-cAMPS (50 $\mu\text{mol/l}$) kokultiviert. Nach Kokultivierung der INS-1 Zellen mit Glucagon und Rp-cAMPS war die IA-2 mRNA signifikant niedriger stimuliert als nach Inkubation der INS-1 Zellen mit Glucagon (siehe Tab.14 und Abb.25).

Stimulans	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
Glucagon	233,4% \pm 20,6% (p<0,05)	126,9% \pm 14,5% (p>0,05; n.s.)
Glucagon + Rp-cAMPS	167,2% \pm 5,3% (p<0,05)	123,4% \pm 13,8% (p>0,05; n.s.)

Tab.13: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon sowie Kostimulation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon und 50 $\mu\text{mol/l}$ Rp-cAMPS. (Anzahl der Versuche: n = 3)

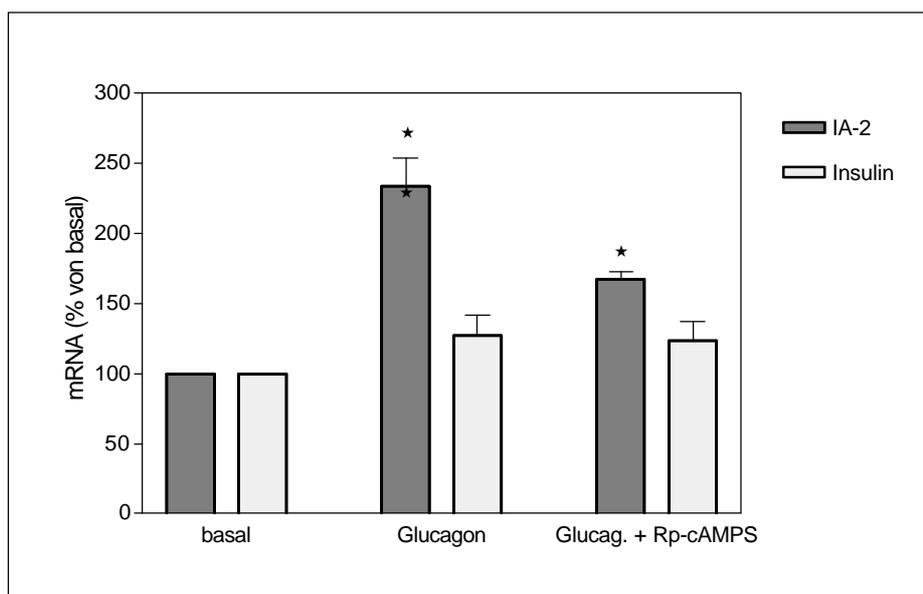


Abb.25: Stimulation der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen nach Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon bzw. Kokultivierung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Glucagon und 50 $\mu\text{mol/l}$ Rp-cAMPS. (Anzahl der Versuche n = 3; *: p<0,05)

4.2.4. Einfluss von Faktoren, die die Insulinsekretion hemmen, auf die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen

Im Gegensatz zum stimulierenden Effekt von Glucose inhibieren einige Faktoren wie z.B. das von den Deltazellen des endokrinen Pankreas sezernierte Hormon Somatostatin und das von Betazellen nach Glucosestimulation gebildete Arachidonsäurederivat Prostaglandin E₂ (PGE₂) die glucose-induzierte Insulinsekretion von Betazellen (Seaquist et al., 1994).

Daher wurde untersucht, ob Somatostatin und PGE₂ auch in INS-1 Zellen die Insulinsekretion inhibieren und einen Effekt auf die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen haben. Die durch LightCycler RT-PCR erhaltenen Stimulationsindices nach 24-stündiger Stimulation der INS-1 Zellen sind in Tab. 14 dargestellt:

Stimulans	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
Somatostatin	119,7% ± 13,3% (p>0,05; n.s.)	93,4% ± 17,9% (p>0,05; n.s.)
Prostaglandin E ₂	86,4% ± 13,2% (p>0,05; n.s.)	51,9% ± 0,7% (p<0,05)

Tab.14: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10 µmol/l Somatostatin bzw. 0,5 µmol/l Prostaglandin E₂. (Anzahl der Versuche: n = 3)

Weder Somatostatin noch PGE₂ hatten einen signifikanten Effekt auf die IA-2 mRNA-Expression der INS-1 Zellen. Dagegen wurde die Insulin mRNA-Expression von PGE₂ auf 51,9% inhibiert, während Somatostatin auch auf die Insulin mRNA keinen signifikanten Effekt hatte (siehe Abb. 26).

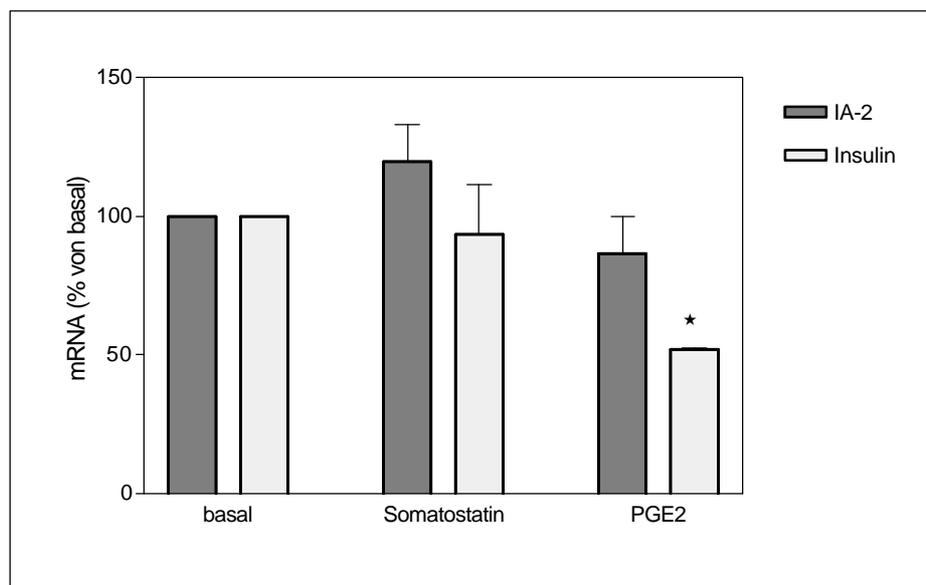


Abb.26: Einfluss von Somatostatin und PGE₂ auf die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen (Anzahl der Versuche n=3; *: p<0,05)

Der Effekt von Somatostatin und PGE₂ auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen wurde ebenfalls untersucht. Beide Faktoren inhibierten auch in INS-1 Zellen die Insulinsekretion (siehe Tab.15 und Abb.27).

Stimulans	Insulingehalt im INS-1 Kulturmedium
basal	261,9 ng/ml \pm 15,2 ng/ml
Somatostatin	135,4 ng/ml \pm 12,4 ng/ml (p<0,05)
PGE ₂	152,5 ng/ml \pm 13,4 ng/ml (p<0,05)

Tab. 15: Insulingehalt im Kulturmedium von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit 10 μ mol/l Somatostatin bzw. 0,5 μ mol/l PGE₂ im Vergleich zu unstimulierten INS-1 Zellen. (Anzahl der Versuche: n = 3)

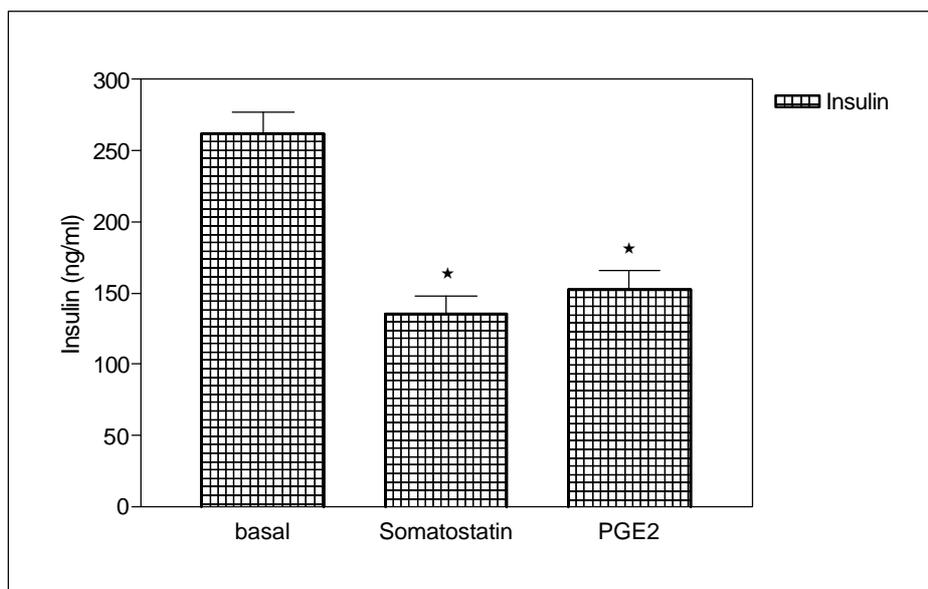


Abb.27: Inhibition der Insulinsekretion von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 10 μ mol/l Somatostatin bzw. 0,5 μ mol/l PGE₂. (Anzahl der Versuche: n = 3; *: p<0,05)

4.2.5. Glucose und synthetische cAMP-Stimulantien stimulieren die mRNA Expression von IA-2 auch in primären Inseln von Ratten

Nachdem Glucose und Substanzen, die eine Erhöhung des intrazytoplasmatischen cAMP-Gehalts bewirken, als Stimulatoren der IA-2 Genexpression in der INS-1 Zell-Linie identifiziert wurden, sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch in primären Inseln auftritt. Dazu wurden frisch isolierte Langerhans'sche Inseln der Ratte für 48 Stunden mit 6 mmol/l Glucose inkubiert (basale Kontrollen) bzw. mit 10 mmol/l Glucose, Forskolin oder IBMX stimuliert. Die in Tab. angegebenen Stimulationsindices für die mRNA Expression von IA-2 und Insulin wurden mittels LightCycler RT-PCR bestimmt:

Stimulans	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
10 mM Glucose	207,4% ± 37,5% (p<0,05)	161,4% ± 9,2% (p<0,05)
Forskolin	250,1% ± 39,5% (p<0,05)	127,9% ± 1,1% (p>0,05; n.s.)
IBMX	382,9% ± 11,8% (p<0,01)	111,7% ± 15,2% (p>0,05; n.s.)

Tab.16: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 48 Stunden Stimulation der primären Ratten-Inseln mit 10 mmol/l Glucose, 10 µmol/l Forskolin bzw. 100 µmol/l IBMX. (Anzahl der Versuche: n = 3)

Sowohl eine Erhöhung der Glucose-Konzentration auf 10 mmol/l als auch eine Inkubation mit den synthetischen cAMP-Stimulantien regulierten die mRNA Expression von IA-2 in primären Langerhans'schen Inseln der Ratte hoch (siehe Abb.28). Eine Stimulation der Inseln mit 10 mmol/l Glucose steigerte die IA-2 mRNA auf 207% im Vergleich zur basalen Expression bei einer Glucosekonzentration von 6 mmol/l. Wie auch bei INS-1 Zellen bewirkte eine Stimulation der Inseln mit Forskolin oder IBMX eine stärkere Erhöhung der IA-2 Expression auf 250% bzw. 383%. Im Gegensatz zu dieser Übereinstimmung bei der Stimulation der IA-2 Expression zwischen dem verwendeten Modell der INS-1 Zell-Linie und primären Inseln war die Insulin mRNA Expression in primären Inseln anders reguliert als in der INS-1 Zell-Linie. Die auf 10 mmol/l erhöhte Glucose-Konzentration steigerte in primären Inseln auch die Expression der Insulin mRNA statt sie zu inhibieren wie in der INS-1 Zell-Linie. Dagegen hatten Forskolin und IBMX in primären Inseln keinen signifikanten Einfluss auf die Insulin mRNA Expression, während sie in der INS-1 Zell-Linie die Insulin Expression steigerten.

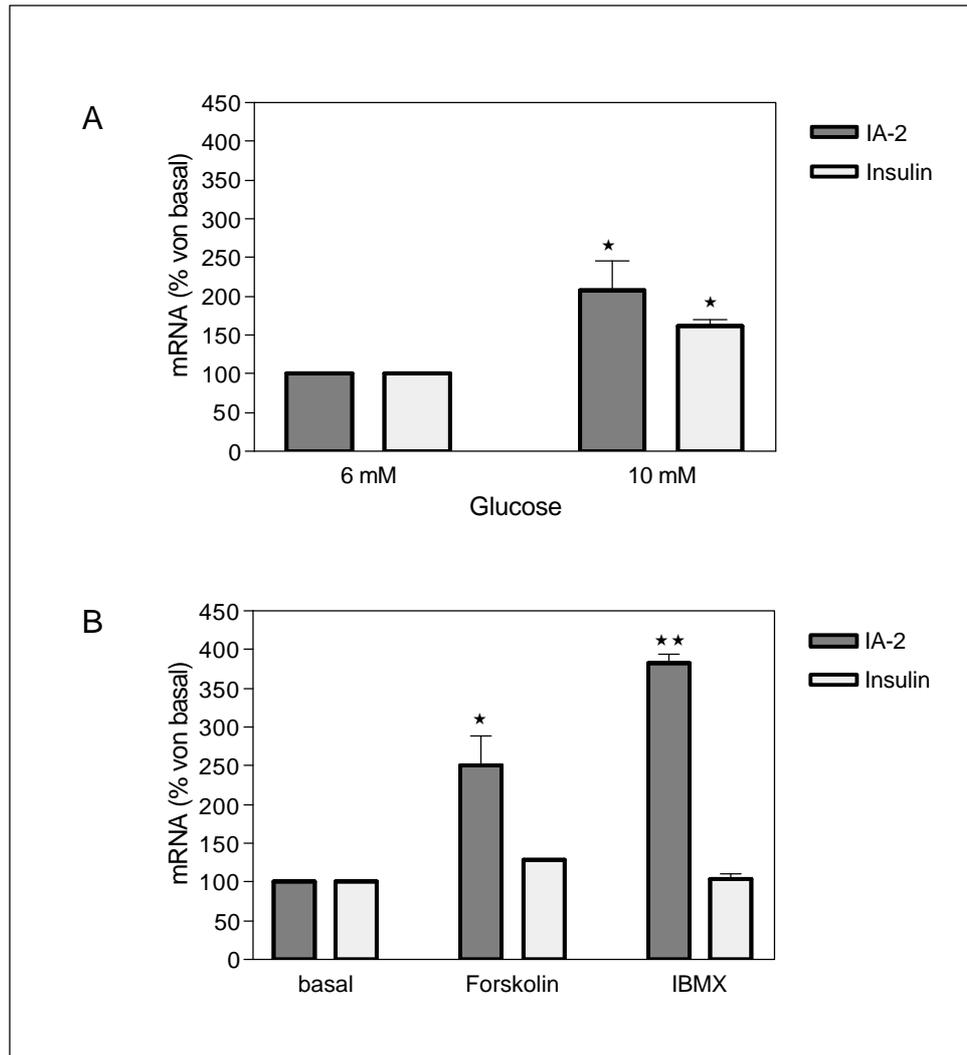


Abb.28: Stimulation der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin nach 48 Stunden Inkubation der primären Ratten-Inseln mit 10 mmol/l Glucose (A) bzw. 10 μ mol/l Forskolin oder 100 μ mol/l IBMX. Die nichtstimulierten Kontroll-Inseln wurden 48 Stunden bei 6 mmol/l Glucose kultiviert. (Anzahl der Versuche: n = 3; *: p<0,05, **: p<0,01)

4.3. Einfluss von Zytokinen auf die Expression von IA-2 und Insulin

4.3.1. Proinflammatorische Zytokine inhibieren die mRNA Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen

4.3.1.1. Dosisabhängigkeit der Zytokin-induzierten Inhibition der mRNA Expression von IA-2 und Insulin

In initialen Experimenten wurde zunächst untersucht, ob die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die Genexpression von IA-2 und Insulin beeinflussen. Dazu wurde die INS-1 Zell-Linie für 24 Stunden mit den Zytokinen in den in Tabelle 17 angegebenen Konzentrationen inkubiert und mittels LightCycler RT-PCR die Stimulationsindices für IA-2 und Insulin bestimmt.

Zytokin	Konzentration	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
IL-1 β	0,1 U/ml	101,2% \pm 3,5% (p>0,05; n.s.)	88,6% \pm 1,9% (p>0,05; n.s.)
	1 U/ml	78,1% \pm 1,3% (p<0,05)	74,8% \pm 3,6% (p<0,05)
	10 U/ml	63,2% \pm 2,0% (p<0,05)	8,4% \pm 1,7% (p<0,001)
	50 U/ml	60,5% \pm 8,1% (p<0,05)	7,7% \pm 1,8% (p<0,001)
TNF- α	10 U/ml	88,8% \pm 2,5% (p>0,05; n.s.)	88,4% \pm 3,6% (p>0,05; n.s.)
	100 U/ml	68,0% \pm 7,8% (p>0,05; n.s.)	36,8% \pm 4,3% (p<0,05)
	500 U/ml	72,0% \pm 2,9% (p<0,05)	39,6% \pm 2,5% (p<0,05)
	1000 U/ml	67,1% \pm 3,0% (p<0,05)	29,6% \pm 9,8% (p<0,05)
IFN- γ	1 U/ml	83,8% \pm 5,5% (p>0,05; n.s.)	93,3% \pm 4,1% (p>0,05; n.s.)
	10 U/ml	68,6% \pm 11,7% (p>0,05; n.s.)	71,8% \pm 2,0% (p<0,05)
	100 U/ml	52,7% \pm 4,0% (p<0,01)	47,0% \pm 4,7% (p<0,01)
	500 U/ml	62,3% \pm 4,8% (p<0,05)	50,5% \pm 0,6% (p<0,01)
	1000 U/ml	61,8% \pm 2,6% (p<0,05)	45,9% \pm 3,0% (p<0,01)

Tab.17: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α und IFN- γ .
(Anzahl der Versuche: n = 2-3)
Die hervorgehobenen Zytokin-Konzentrationen wurden für die nachfolgende Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Zytokinwirkung verwendet.

Wie in Abb.29 dargestellt, hemmten die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ nach 24 Stunden Stimulation dosisabhängig die mRNA Expression von IA-2 und Insulin. Die durch die Inkubation mit den Zytokinen verursachte Inhibition der Insulin mRNA war dabei bei IL-1 β und TNF- α stärker als die Inhibition der IA-2 mRNA Expression, während IFN- γ die Expression beider Autoantigene fast gleich stark hemmte. Eine signifikante, reproduzierbare Inhibition beider Autoantigene war bereits bei relativ niedrigen Zytokin-Konzentrationen zu beobachten. Die stärksten Effekte verursachte IL-1 β , das schon bei einer Konzentration von 1 U/ml beide Autoantigene leicht hemmte und bei Konzentrationen von 10 U/ml und 50 U/ml die mRNA Expression IA-2 jeweils auf etwa 60% und von Insulin auf etwa 8% der basalen Werte inhibierte. TNF- α bewirkte ab einer Konzentration von 100 U/ml eine signifikante Hemmung der IA-2 Expression auf etwa 70% und der Insulin Expression auf etwa 40% der basalen Werte, die auch bei Verwendung höherer Konzentrationen von TNF- α nur leicht verstärkt war. Die Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit 10 U/ml IFN- γ hemmte beide Autoantigene leicht, während ab einer Konzentration von 100 U/ml IFN- γ die Expression beider Autoantigene auf jeweils etwa 50% der basalen Werte inhibiert war.

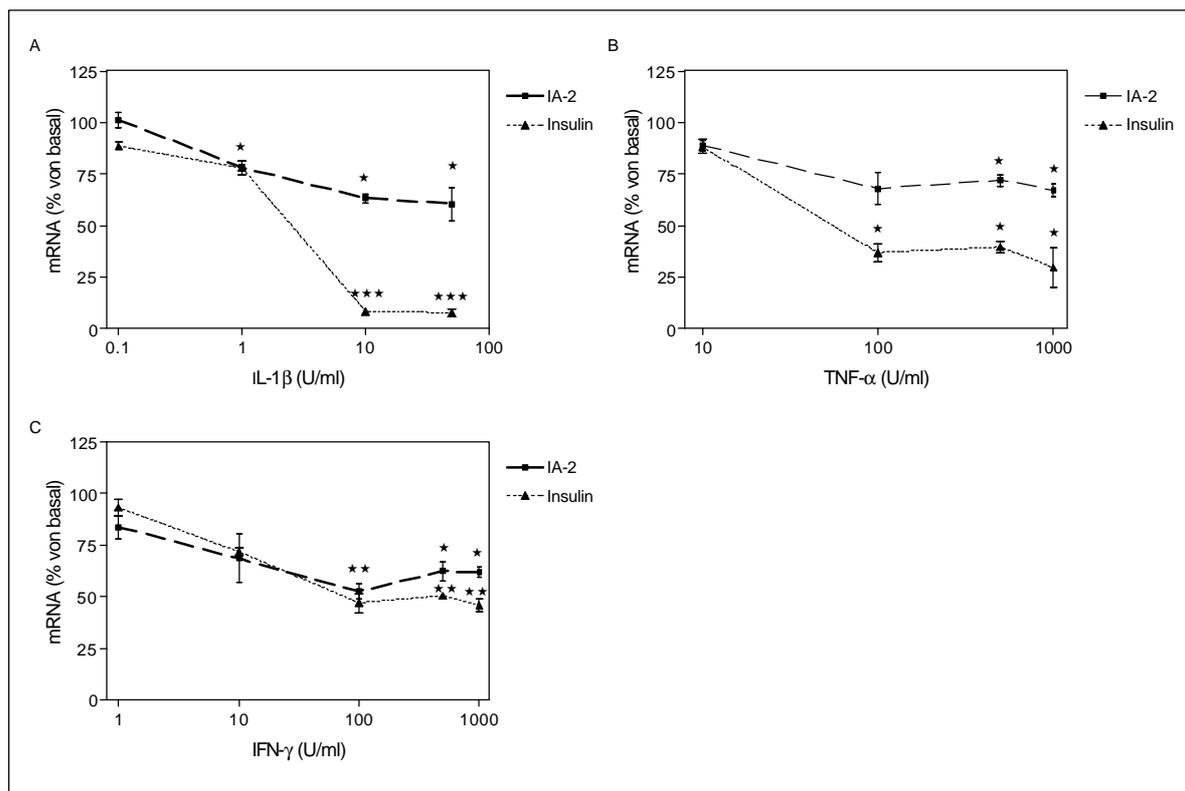


Abb.29: Dosisabhängige Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA Expression von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β (A), TNF- α (B) und IFN- γ (C).

(Anzahl der Versuche n = 2-3; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Zusätzlich zu den proinflammatorischen Zytokinen wurde untersucht, ob das Th1-spezifische Zytokin IL-2 und das Th2-spezifische Zytokin IL-4 die Expression von IA-2 und Insulin beeinflussen. Die Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit IL-2 und IL-4 in den angegebenen Konzentrationen sind in Tab. 18 dargestellt.

Zytokin	Konzentration	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
IL-2	10 U/ml	97,8% ± 5,3% (p>0,05; n.s.)	100,4% ± 8,6% (p>0,05; n.s.)
	20 U/ml	96,3% ± 10,6% (p>0,05; n.s.)	92,7% ± 5,9% (p>0,05; n.s.)
	100 U/ml	92,8% ± 3,7% (p>0,05; n.s.)	76,9% ± 10,0% (p>0,05; n.s.)
IL-4	10 ng/ml	108,8% ± 5,9% (p>0,05; n.s.)	62,8% ± 4,7% (p<0,05)
	50 ng/ml	91,6% ± 1,5% (p>0,05; n.s.)	56,2% ± 0,5% (p<0,01)
	100 ng/ml	103,7% ± 7,4% (p>0,05; n.s.)	64,0% ± 1,4% (p<0,01)

Tab.18: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit verschiedenen Konzentrationen von IL-2 und IL-4.
(Anzahl der Versuche: n = 2-3)

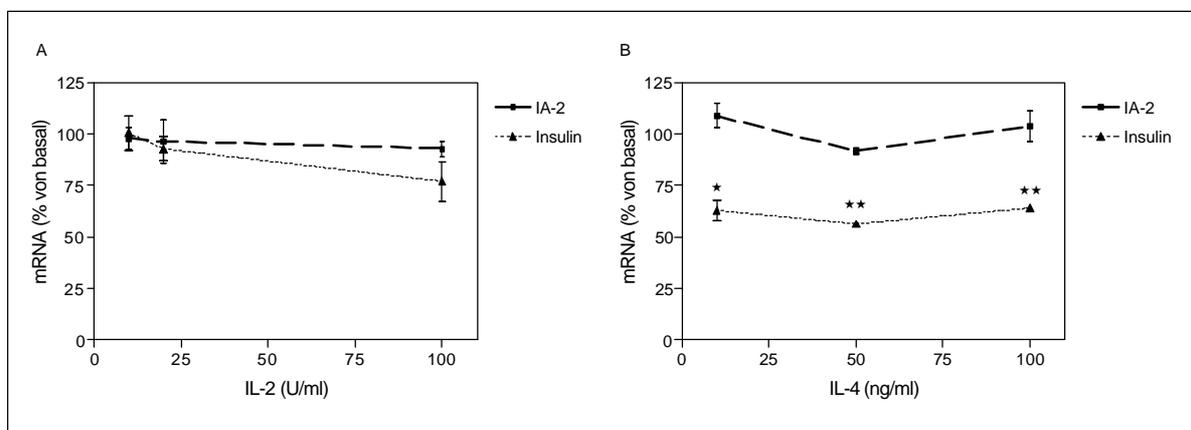


Abb.30: 24 Stunden Stimulation von INS-1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Zytokine IL-2 (A) und IL-4 (B) beeinflusst die mRNA Expression von IA-2 nicht und inhibiert die Insulin mRNA leicht.
(Anzahl der Versuche n = 2-3; *: p<0,05, **: p<0,01)

Abb. 30 zeigt, dass eine Stimulation mit IL-2 bei keiner der verwendeten Konzentrationen zu einer signifikanten Änderung der Expression beider Autoantigene führte. Bei Stimulation mit IL-4 war die Expression von IA-2 ebenfalls nicht beeinflusst, während die Expression von Insulin unabhängig von der verwendeten IL-4 Konzentration auf etwa 60% der basalen Werte inhibiert war.

4.3.1.2. Zeitabhängigkeit des Zytokin-induzierten Effekts auf die mRNA Expression von IA-2 und Insulin

Um die Abhängigkeit der Zytokin-induzierten Hemmung der mRNA Expression beider Autoantigene von der Zeitdauer der Stimulation zu untersuchen, wurde die INS-1 Zell-Linie für 6, 24 und 48 Stunden mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ inkubiert, wobei Zytokin-Konzentrationen eingesetzt wurden, die nach 24 Stunden Inkubation eine signifikante, reproduzierbare Hemmung sowohl von IA-2 als auch von Insulin bewirkt hatten (siehe 4.3.1.1.). Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

IL-1 β : 50 U/ml

TNF- α : 500 U/ml

IFN- γ : 100 U/ml

Die nach der LightCycler RT-PCR erhaltenen Stimationsindices für IA-2 und Insulin sind in Tab. 19 angegeben.

Zytokin	Stimulationsdauer	IA-2 Stimationsindex	Insulin Stimationsindex
IL-1 β	6 h	73,4% \pm 1,7% (p<0,05)	39,1% \pm 15,0% (p>0,05; n.s.)
	24 h	60,5% \pm 8,1% (p<0,05)	7,7% \pm 1,8% (p<0,001)
	48 h	44,8% \pm 3,6% (p<0,05)	11,2% \pm 0,1% (p<0,001)
TNF- α	6 h	67,4% \pm 4,3% (p<0,05)	69,2% \pm 15,3% (p>0,05; n.s.)
	24 h	72,0% \pm 2,9% (p<0,05)	39,6% \pm 2,5% (p<0,05)
	48 h	64,5% \pm 1,7% (p<0,01)	54,7% \pm 6,0% (p<0,05)
IFN- γ	6 h	73,1% \pm 10,4% (p>0,05; n.s.)	64,5% \pm 8,0% (p>0,05; n.s.)
	24 h	52,7% \pm 4,0% (p<0,01)	47,0% \pm 4,7% (p<0,01)
	48 h	66,1% \pm 18,1% (p>0,05; n.s.)	61,0% \pm 0,6% (p<0,01)

Tab. 19: Stimationsindices für IA-2 und Insulin nach 6, 24 und 48 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 50 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α bzw. 100 U/ml IFN- γ . (Anzahl der Versuche: n = 2-3)

Wie in Abb. 31 dargestellt, bewirkt die Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit den drei proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ bereits nach 6 Stunden eine Inhibition sowohl der IA-2 als auch der Insulin mRNA Expression auf jeweils etwa 70% der basalen Werte mit der Ausnahme von IL-1 β , das die Insulin-Expression nach 6 Stunden auf 39% hemmt. Eine direkte zytotoxische Wirkung der Zytokine auf die INS-1 Zell-Linie war nach 6

Stunden Inkubation dagegen nicht zu beobachten: Die Zytokin-stimulierten Zellen unterschieden sich im Lichtmikroskop morphologisch nicht von unbehandelten Kontrollzellen und auch ihre mittels MTS-Assay ermittelte metabolische Aktivität war nicht beeinträchtigt. Bei einer Verlängerung der Stimulationsdauer auf 24 Stunden war die Hemmung der IA-2 und Insulin mRNA Expression deutlich verstärkt. Nach 24 Stunden Stimulation waren auch direkte zytotoxische Effekte der Zytokine auf die INS-1 Zellen nachweisbar, die zwar keine lichtmikroskopisch detektierbaren morphologischen Veränderungen zur Folge hatten, aber die metabolische Aktivität der Zellen beeinträchtigten: Die metabolische Aktivität der INS-1 Zellen im MTS-Assay betrug nach 24 Stunden Stimulation mit 50 U/ml IL-1 β 77% \pm 11%, mit 500 U/ml TNF- α 90% \pm 4% und mit 100 U/ml IFN- γ 67% \pm 2% der unbehandelten Kontrollzellen. Eine längere Stimulation der INS-1 Zell-Linie bewirkte nach 48 Stunden Inkubation mit den Zytokinen nur bei IL-1 β eine weitere Inhibition der IA-2 Expression auf 45% des basalen Wertes, während bei TNF- α und bei IFN- γ weder die Hemmung der IA-2 noch der Insulin Expression gegenüber einer 24-stündigen Stimulation verstärkt war.

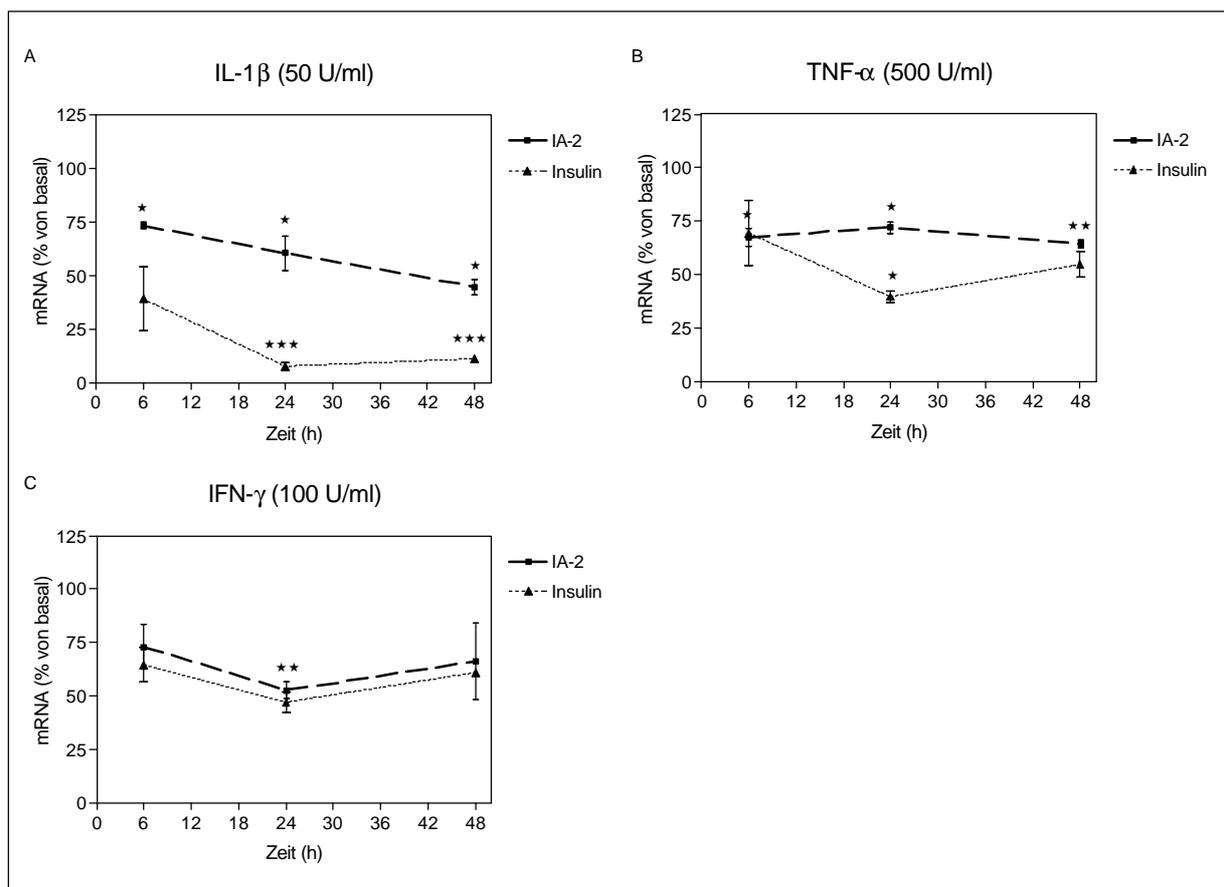


Abb. 31: Inhibition der mRNA Expression von IA-2 und Insulin nach 6, 24 und 48 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 50 U/ml IL-1 β (A), 500 U/ml TNF- α (B) bzw. 100 U/ml IFN- γ (C). (Anzahl der Versuche: n = 2-3; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

4.3.1.3. Die Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA Expression wird durch Stimulation mit Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine potenziert

Es wurden zwei Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine getestet (ZK 1 und ZK 2), mit denen die INS-1 Zell-Linie für 6 und 24 Stunden stimuliert wurde:

ZK 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ

ZK 2: 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ .

Die durch LightCycler RT-PCR ermittelten Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach Stimulation mit den beiden Zytokin-Kombinationen sind in Tab. 19 angegeben.

Zytokin-Kombination	Stimulationsdauer	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
ZK 1	6 h	52,9% \pm 4,9% (p<0,01)	41,5% \pm 8,6% (p<0,01)
	24 h	21,7% \pm 1,8% (p<0,001)	6,3% \pm 1,8% (p<0,001)
ZK 2	6 h	55,9% \pm 6,8% (p<0,01)	55,8% \pm 13,9% (p<0,05)
	24 h	41,6% \pm 10,1% (p<0,05)	8,3% \pm 3,8% (p<0,01)

Tab. 19: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 6 und 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (ZK 1) bzw. 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (ZK 2).
(Anzahl der Versuche: n = 3-4)

Sowohl die IA-2- als auch die Insulin-mRNA Expression der INS-1 Zell-Linie wurde durch Stimulation mit den Zytokin-Kombinationen in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Inkubation signifikant gehemmt (siehe Abb. 32), wobei die inhibitorische Wirkung der einzelnen Zytokine durch die kombinierte Inkubation verstärkt war. Nach 6 Stunden Stimulation inhibierten beide Zytokin-Kombinationen die IA-2-Expression auf jeweils etwa 50% der basalen Werte, während die Insulin-Expression durch die Zytokin-Kombination ZK 1 stärker gehemmt wurde als durch ZK 2 (41% versus 56% der basalen Werte). Diese Inhibition war wie bei der 6-stündigen Stimulation mit den einzelnen Zytokinen nicht mit einer Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität der Zellen oder mit im Lichtmikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen verbunden. Nach einer 24-stündigen Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit den beiden Zytokin-Kombinationen war die IA-2-Expression durch ZK 1 stärker inhibiert als durch ZK 2 (22% versus 42% der basalen Werte), während die Insulin-Expression durch beide Zytokin-Kombinationen etwa gleich stark gehemmt wurde (6% und 8% der basalen Werte). Diese Hemmung der Insulin-Expression durch beide Zytokin-Kombinationen entspricht der maximalen durch IL-1 β allein induzierten Hemmung. Zusätzlich zu der inhibierenden Wirkung

auf die Expression von IA-2 und Insulin verminderte eine 24-stündige Inkubation mit beiden Zytokin-Kombinationen auch die metabolische Aktivität der INS-1 Zell-Linie im MTS-Assay, die nach Inkubation mit ZK 1 $57\% \pm 6\%$ und mit ZK 2 $60\% \pm 6\%$ betrug. Eine weiter verlängerte 48-stündige Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit den beiden Zytokin-Kombinationen hatte eine im Lichtmikroskop sichtbare Zerstörung des größten Teils der Zellen zur Folge. Deshalb wurde auf die Bestimmung von IA-2- und Insulin-Stimulationsindices nach 48 Stunden Inkubation mit den Zytokin-Kombinationen verzichtet.

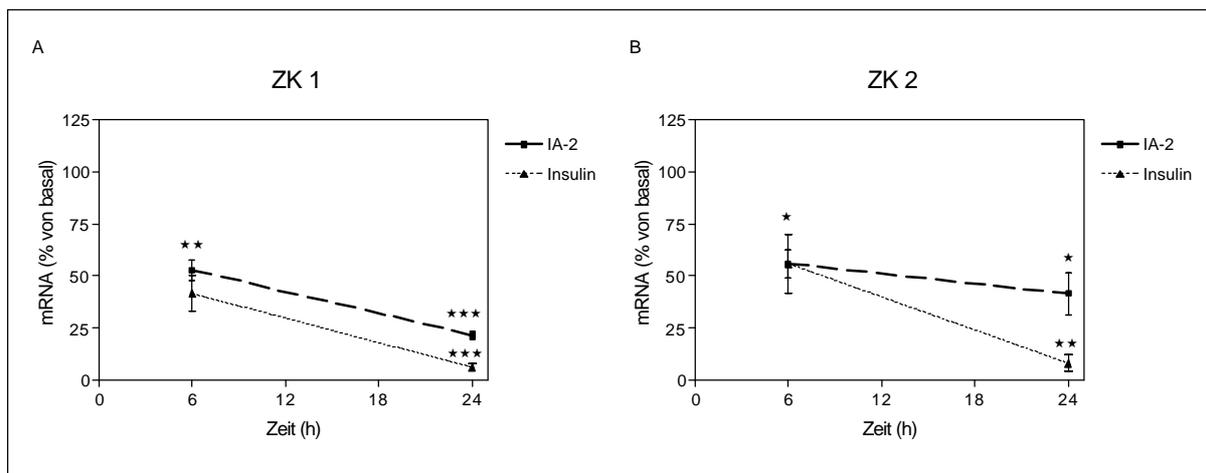


Abb. 32: Inhibition der mRNA Expression von IA-2 und Insulin nach 6 und 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit Zytokinkombination 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (A) bzw. Zytokinkombination 2: 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (B). (Anzahl der Versuche: n = 3-4; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

4.3.1.4. Proinflammatorische Zytokine inhibieren auch die Insulinsekretion der INS-1 Zell-Linie

Die proinflammatorischen Zytokine inhibierten zusätzlich zur IA-2 und Insulin mRNA-Expression auch die Sekretion von Insulin durch die INS-1 Zell-Linie. Die Inhibition der Insulinsekretion war verstärkt, wenn die INS-1 Zellen mit Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine inkubiert wurden. In Tab. 20 und in Abb. 33 sind die mittels Insulin-RIA bestimmten Insulin-Konzentrationen im Kulturüberstand der INS-1 Zellen nach Zytokin-Stimulation zusammengefasst.

Zytokin	Insulingehalt im INS-1 Kulturmedium
basal	261,7 ng/ml \pm 11,0 ng/ml
IL-1 β (50 U/ml)	83,2 ng/ml \pm 4,2 ng/ml (p<0,05)
TNF- α (500 U/ml)	133,9 ng/ml \pm 9,7 ng/ml (p<0,05)
IFN- γ (100 U/ml)	107,3 ng/ml \pm 6,4 ng/ml (p<0,05)
ZK 1	73,3 ng/ml \pm 8,2 ng/ml (p<0,05)
ZK 2	58,2 ng/ml \pm 0,8 ng/ml (p<0,01)

Tab. 20: Insulingehalt im Kulturmedium nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 50 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α , 100 U/ml IFN- γ , 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (ZK 1) bzw. 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ (ZK 2). (Anzahl der Versuche: n = 3-4)

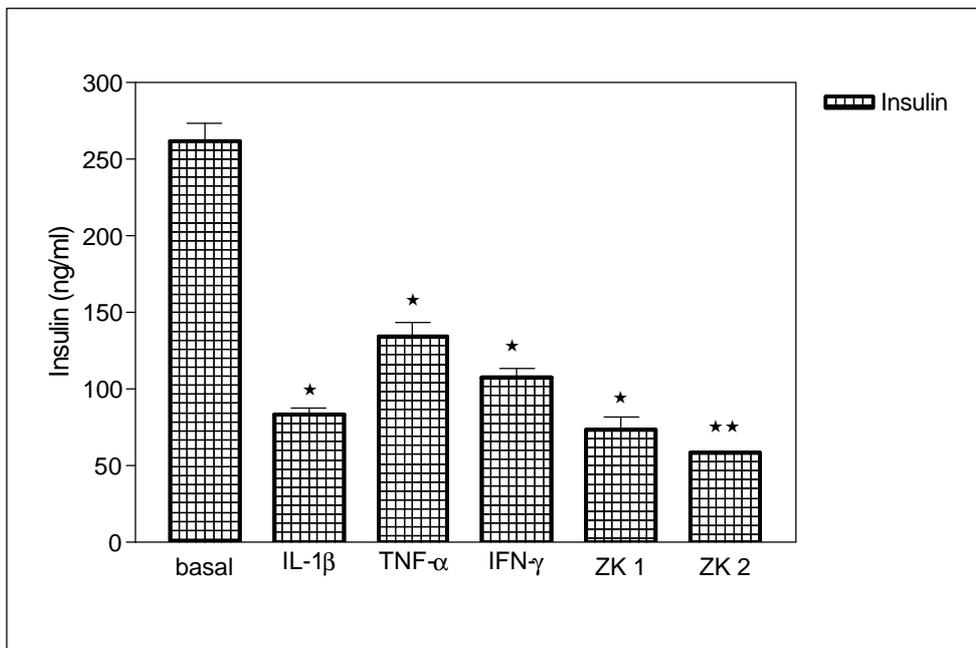


Abb. 33: Inhibition der Insulinsekretion nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit 50 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α , 100 U/ml IFN- γ , Zytokinkombination 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ bzw. Zytokinkombination 2: 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ . (Anzahl der Versuche: n = 3-4; *: p<0,05, **: p<0,01)

4.3.2. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Mediator der Zytokin-induzierten Inhibition von IA-2 und Insulin

IL-1 β und TNF- α induzieren nach 4-6 Stunden in primären pankreatischen Inseln die Expression des Enzyms induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), das die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin katalysiert (Southern et al., 1990). Daher wurde untersucht, ob die verwendeten proinflammatorischen Zytokine auch in der INS-1 Zell-Linie die Bildung von NO induzieren können. Die Menge des produzierten Stickstoffmonoxids wurde durch Messung seines Abbauproduktes Nitrit im Zellkulturüberstand mittels eines Griess-Tests bestimmt. IL-1 β und (in geringerem Umfang) TNF- α stimulierten in der INS-1 Zell-Linie zeitabhängig die Produktion von NO, während die Inkubation der INS-1 Zellen mit IFN- γ nicht zu einer erhöhten NO-Produktion führte (siehe Tab. 21 und Abb. 34 A).

Zytokin	Nitrit im Zellüberstand		
	6 Stunden Stimulation	24 Stunden Stimulation	48 Stunden Stimulation
basal	0,0 $\mu\text{mol/l}$	0,0 $\mu\text{mol/l}$	0,0 $\mu\text{mol/l}$
IL-1 β	2,2 \pm 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,05)	22,8 \pm 2,3 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,05)	32,5 \pm 1,3 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,01)
TNF- α	0,0 $\mu\text{mol/l}$	2,1 \pm 1,2 $\mu\text{mol/l}$ (p>0,05; n.s.)	4,6 \pm 0,3 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,05)
IFN- γ	0,0 $\mu\text{mol/l}$	0,0 $\mu\text{mol/l}$	0,0 $\mu\text{mol/l}$

Tab. 21: Nitritgehalt in Zellkulturüberständen von INS-1 Zellen nach 6, 24 und 48 Stunden Stimulation mit 50 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α bzw. 100 U/ml IFN- γ (Anzahl der Versuche n = 3)

Eine Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine bewirkte eine Verstärkung der NO-Produktion. IFN- γ potenzierte die durch IL-1 β und TNF- α induzierte NO-Produktion (siehe Tab. 22 und Abb. 34 B).

Zytokin-Kombination	Nitrit im Zellüberstand	
	6 Stunden Stimulation	24 Stunden Stimulation
basal	0,0 $\mu\text{mol/l}$	0,0 $\mu\text{mol/l}$
ZK 1	3,8 \pm 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,01)	23,2 \pm 1,0 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,01)
ZK 2	0,6 \pm 0,2 $\mu\text{mol/l}$ (p>0,05; n.s.)	15,6 \pm 0,8 $\mu\text{mol/l}$ (p<0,01)

Tab. 22: Nitritgehalt in Zellkulturüberständen von INS-1 Zellen nach 6 und 24 Stunden Stimulation mit Kombinationen der Zytokine (ZK 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ ; ZK 2: 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ). (Anzahl der Versuche n = 3-4)

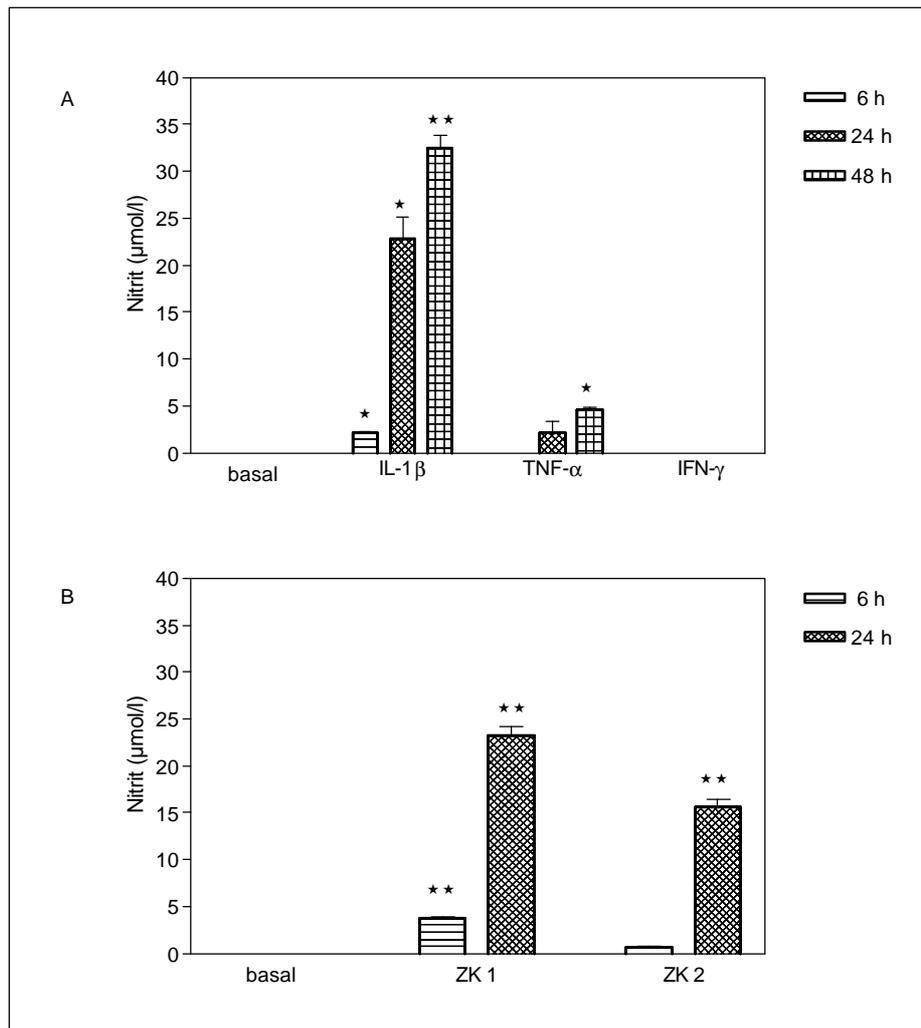


Abb. 34: 50 U/ml IL-1 β bzw. 500 U/ml TNF- α induzieren in INS-1 Zellen die Produktion von Stickstoffmonoxid, während 100 U/ml IFN- γ keinen Effekt hat (A). Die NO-Produktion der INS-1 Zellen ist durch Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine potenziert (B). Die Produktion von Stickstoffmonoxid wurde durch Bestimmung des Nitritgehalts im Kulturmedium der INS-1 Zellen nachgewiesen. (Anzahl der Versuche n = 3-4; *: p<0,05, **: p<0,01)

Eine 24-stündige Ko-Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit der Zytokinkombination ZK 1, die nach 24 Stunden Stimulation die stärkste Inhibition der IA-2 und der Insulin mRNA Expression und die höchste Produktion von Stickstoffmonoxid bewirkt hatte, mit dem iNOS-Inhibitor N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) führte zu einer fast vollständigen Blockierung der Zytokin-stimulierten NO-Produktion. Diese Blockierung der NO-Produktion durch L-NMMA verminderte die Zytokin-stimulierte Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA-Expression, konnte aber die basalen Werte nicht wiederherstellen. (siehe Tab. 23 und 24 sowie Abb. 35).

Nach 6 Stunden Stimulation der INS-1 Zell-Linie mit dem synthetischen NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) wurde ein ähnlich hoher Nitritgehalt im Zellüberstand gemessen wie nach 24 Stunden Stimulation mit der Zytokin-Kombination ZK 1. Das durch den synthetischen NO-Donor SNAP in den INS-1 Zellen freigesetzte Stickstoffmonoxid bewirkte ebenfalls eine signifikante Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA-Expression (siehe Tab. 23 und 24 sowie Abb. 35).

Stimulans	Nitrit im Zellüberstand
basal	0,0 $\mu\text{mol/l}$
ZK 1	23,2 $\mu\text{mol/l} \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,01$)
ZK 1 + L-NMMA	1,3 $\mu\text{mol/l} \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$ ($p > 0,05$; n.s.)
SNAP	20,8 $\mu\text{mol/l} \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,01$)

Tab. 23: Nitritgehalt in Zellkulturüberständen von INS-1 Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit der Zytokinkombination 1 (ZK 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ) und Kostimulation mit ZK 1 und 4 mM L-NMMA sowie 6 Stunden Stimulation mit 250 μM SNAP. (Anzahl der Versuche n = 3)

Stimulant	IA-2 Stimulationsindex	Insulin Stimulationsindex
basal	100,0	100,0
ZK 1	21,7% $\pm 1,8\%$ ($p < 0,001$)	6,3% $\pm 1,8\%$ ($p < 0,001$)
ZK 1 + L-NMMA	64,2% $\pm 3,7\%$ ($p < 0,05$)	30,9% $\pm 4,5\%$ ($p < 0,01$)
SNAP	50,7% $\pm 6,4\%$ ($p < 0,05$)	30,0% $\pm 6,1\%$ ($p < 0,01$)

Tab. 24: Stimulationsindices für IA-2 und Insulin nach 24 Stunden Stimulation der INS-1 Zellen mit der Zytokinkombination 1 (ZK 1: 10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ) und Kostimulation mit ZK 1 und 4 mM L-NMMA sowie 6 Stunden Stimulation mit 250 μM SNAP. (Anzahl der Versuche n = 3)

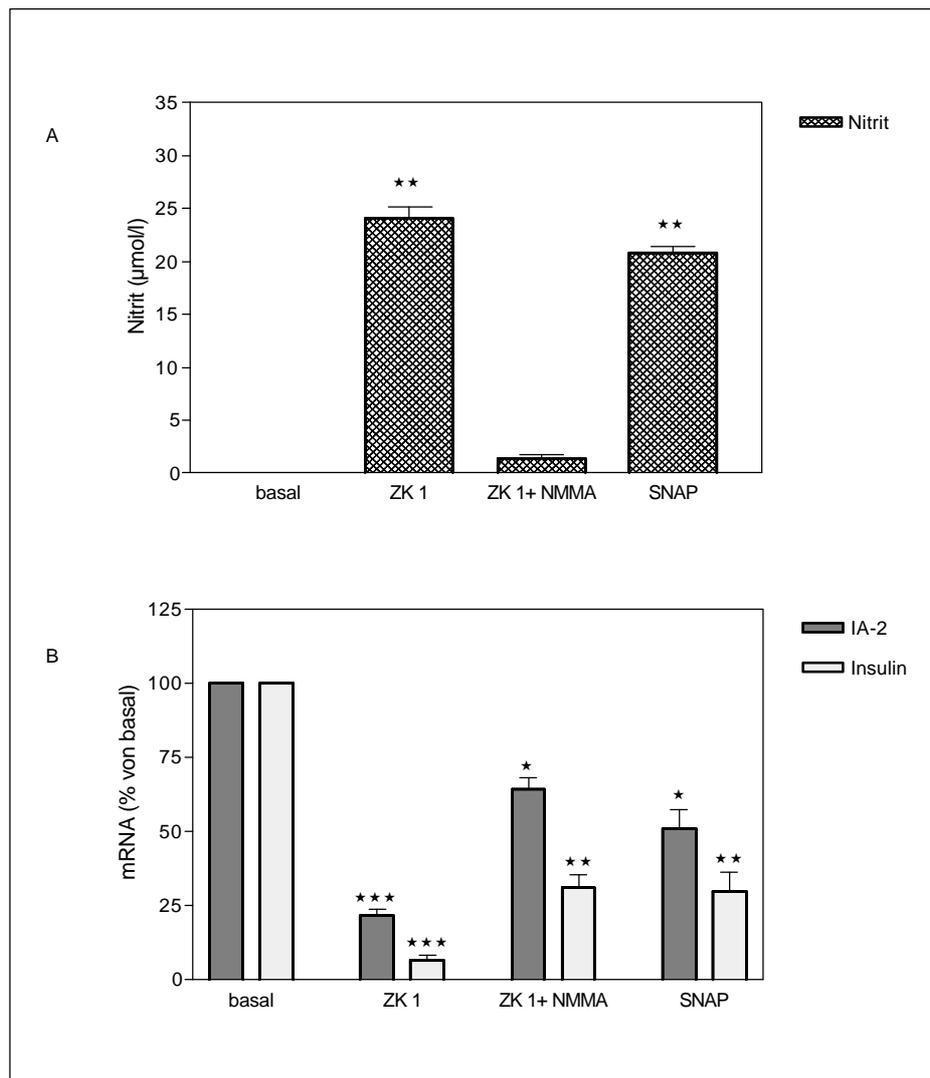


Abb. 35: Nitritgehalt in Kulturüberständen von INS-1 Zellen (A) im Vergleich zur mRNA Expression von IA-2 und Insulin (B) nach Stimulation der INS-1 Zellen mit der Zytokinkombination 1 (10 U/ml IL-1 β + 500 U/ml TNF- α + 100 U/ml IFN- γ) und Kostimulation von ZK 1 mit 4 mM L-NMMA für 24 Stunden sowie Stimulation mit 250 μ M SNAP für 6 Stunden. (Anzahl der Versuche n = 3; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

Die inverse Korrelation zwischen Zytokin-stimulierter NO-Produktion der INS-1 Zell-Linie und der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin sowie die direkte NO-induzierte Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA nach Inkubation mit einem synthetischen NO-Donor zeigen, dass Stickstoffmonoxid in die durch proinflammatorische Zytokine bewirkte Inhibition der Genexpression beider Autoantigene involviert ist.

5. Diskussion

5.1. Die Regulation der Genexpression von IA-2 durch metabolische und hormonelle Stimulantien

IA-2, auch bekannt als Inselzellantigen ICA 512, gehört mit Insulin und Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) zu den wichtigsten Targetproteinen der humoralen und zellulären Autoimmunantwort bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes (Verge et al., 1996; Durinovic-Bellò et al., 1996). Es weist in seiner carboxyterminalen, intrazytoplasmatischen Domäne Strukturhomologien zu rezeptor-assoziierten Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) auf, ohne jedoch eine enzymatische Aktivität gegenüber bekannten PTP-Substraten zu besitzen (Lan et al., 1994; Notkins et al., 1998). IA-2 ist in den Membranen der sekretorischen Granula von neuroendokrinen Zellen angereichert, z.B. in den insulin-sekretorischen Granula der Betazellen des endokrinen Pankreas (Solimena et al., 1996). Über die biologische Funktion von IA-2 ist aber, im Gegensatz zu seiner gut definierten Rolle als diabetes-assoziiertes Autoantigen, bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, dass es in die regulierte Sekretion der in neurosekretorischen Granula gespeicherten Peptidhormone involviert ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von metabolischen und hormonellen Faktoren, die die Sekretion und Biosynthese von Insulin stimulieren bzw. inhibieren, auf die Expression von IA-2 untersucht. Dabei wurden die ersten Daten zur Regulation der Genexpression von IA-2 in der insulinproduzierenden Ratten-Betazell-Linie INS-1 sowie in primären, aus Ratten isolierten Inseln, gewonnen. Die Regulation der IA-2-Genexpression durch die verwendeten Stimulantien wurde zusätzlich mit Änderungen bei der Sekretion und der Genexpression von Insulin verglichen.

Für die Analyse der Regulation der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin wurde eine auf dem LightCycler-System basierende neuartige real-time RT-PCR-Technologie etabliert, die eine sehr sensitive und quantitative Messung der IA-2 und Insulin mRNA sowohl in der INS-1 Zell-Linie als auch in primären Inseln ermöglichte. Die real-time Detektion von amplifizierten PCR-Produkten während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion stellt gegenwärtig die genaueste Methode für die Quantifizierung von mRNA-Molekülen dar (Kreuzer et al., 1999; Pfaffl, 2000; Bustin, 2000). Die Zuverlässigkeit der LightCycler-basierten mRNA-Quantifizierung wurde außerdem durch Northern Blot Analyse sowie kompetitive RT-PCR bei einigen ausgewählten Stimulationsexperimenten überprüft, wobei mit allen drei Methoden tendenziell ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

Die Transkription des Insulin-Gens, die Translation der Insulin mRNA und die Sekretion von Insulin durch die Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas werden durch eine Vielzahl von Metaboliten und Hormonen reguliert (Ashcroft und Ashcroft, 1992). Eine erhöhte Glucosekonzentration stellt dabei den wichtigsten metabolischen Stimulus für die Insulin-Biosynthese und Insulinsekretion dar. Sowohl in primären Ratten-Inseln als auch in INS-1 Zellen wurde Glucose in der vorliegenden Arbeit auch als ein Stimulator der mRNA-Expression von IA-2 identifiziert. Eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 6 mmol/l auf 10 mmol/l bewirkte in primären Inseln eine Verdoppelung des IA-2 mRNA Gehalts nach 48 Stunden. Gleichzeitig war auch die Proteinexpression von IA-2 durch die erhöhte Glucosekonzentration stimuliert (persönliche Kommunikation mit Dr. K. Löbner, London). In Übereinstimmung mit anderen Studien (Hedeskov, 1980; Nielsen et al., 1985) hatte die erhöhte Glucosekonzentration bei den primären Ratten-Inseln auch eine erhöhte Akkumulation von Insulin im Kulturmedium und eine gesteigerte mRNA-Expression von Insulin zur Folge. Bei INS-1 Zellen hatte Glucose einen dosis- und zeitabhängigen Effekt auf den IA-2 mRNA Gehalt. Eine signifikante Erhöhung der IA-2 mRNA-Expression wurde erst nach einer Stimulation der INS-1 Zellen über 6 Tage beobachtet. Dies stand im Gegensatz zu der bereits nach 6 Stunden Glucosestimulation erhöhten Akkumulation von Insulin im Kulturmedium der INS-1 Zellen. Paradoxerweise war die mRNA-Expression von Insulin dosis- und zeitabhängig inhibiert, wobei nach 6 Tagen Inkubation der INS-1 Zellen mit 21 mmol/l Glucose die Insulin-Expression maximal auf 21% der basalen Werte inhibiert und die IA-2-Expression maximal auf 223% der basalen Werte stimuliert war. Die glucose-vermittelte Stimulation der IA-2 mRNA-Expression ist somit nur in primären Inseln, nicht aber in der INS-1 Zell-Linie, auch direkt mit einer erhöhten Sekretion und mRNA-Expression von Insulin verbunden. Ein bereits nach 24 Stunden messbarer inhibierender Effekt von erhöhten Glucose-Konzentrationen (≥ 10 mmol/l Glucose) auf die Insulin mRNA-Expression in INS-1 Zellen wurde auch in einer anderen Studie beschrieben (Olson et al., 1998), und scheint nur für die INS-1 Zell-Linie charakteristisch zu sein. Bei primären Inseln und anderen Betazell-Linien (HIT Zellen, betaTC-6 Zellen) haben supraphysiologische Glucosekonzentrationen erst nach einer Langzeitstimulation über mehrere Wochen einen vermutlich durch Glucose-Toxizität verursachten inhibitorischen Effekt auf die Genexpression und Sekretion von Insulin (Yki-Jarvinen, 1992; Robertson et al., 1994; Olson et al., 1993; Poitout et al., 1996).

Glucose wird in Betazellen mittels des Glucosetransporters GLUT-2 aufgenommen und nachfolgend durch das Enzym Glucokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Diese Metabolisierung von Glucose stellt den ersten Schritt bei der Generierung von metabolischen Signalen dar, die für eine glucose-vermittelte transkriptionelle Regulation von Genen verantwortlich sind (Vaulont et al., 2000). Während der genaue Ablauf der folgenden Schritte

sowie die Intermediärprodukte der glucose-vermittelten Signaltransduktion noch diskutiert werden (Girard et al., 1997; Scott et al., 1998; Vaulont et al., 2000), wurden in verschiedenen Studien Transkriptionsfaktoren und Mechanismen beschrieben, die in die transkriptionelle Regulation einzelner Gene durch Glucose involviert sind: Erhöhte Glucose-Konzentrationen bewirken eine Dephosphorylierung des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors Sp1, der dadurch besser an seine Bindungsregion im Promotor der Acetyl-CoA-Carboxylase binden kann und damit die glucose-induzierte Erhöhung der Expression dieses Gens vermittelt (Daniel et al., 1996). In den Promotorregionen der Gene der Pyruvatkinase und des Glucagonrezeptors wurden durch Mutagenese-Studien DNA-Sequenzen identifiziert, die die stimulierende Wirkung von Glucose auf diese Gene vermitteln. Diese als "glucose response elements" bezeichneten Regionen bestehen aus zwei sogenannten E-Boxen mit der palindromischen Sequenz CANNTG, die durch 5 bzw. 3 Basenpaare voneinander getrennt sind (Bergot et al., 1992; Portois et al., 1999). Eine glucose-induzierte Aktivierung der Promotoren wird durch die Bindung von "upstream stimulatory factors" (USFs), Transkriptionsfaktoren aus der "helix-loop-helix leucine zipper"-Familie, vermittelt (Diaz-Guerra et al., 1993). Die Gene für Insulin und IA-2 besitzen in ihrer Promotor-Region mehrere E-Boxen, die aber zu weit voneinander entfernt liegen, um ein "glucose-response-element" zu bilden. Mutagenese-Experimente innerhalb der Insulinpromotor-Region konnten bisher auch kein anderes "glucose-response-element" identifizieren (German und Wang, 1994). In die Stimulation der Transkription des Insulin-Gens durch Glucose ist der Transkriptionsfaktor PDX1 ("pancreatic duodenum homeobox protein 1") involviert. Die Gene des Enzyms Glucokinase und des Glucosetransportes GLUT-2, die den "Glucose-Sensor" von Betazellen bilden, werden ebenfalls durch PDX1 reguliert (Watade et al., 1996; Waeber et al., 1996). Erhöhte Glucosekonzentrationen bewirken in Betazellen eine Phosphorylierung und nachfolgende Translokation von PDX1 in den Zellkern, wo es an sogenannte A-Boxen mit der Kernsequenz TAAT in der Promotor-Region von Insulin bindet und dadurch dessen Transkription steigert (Petersen et al., 1994, 1998; Macfarlane et al., 1999). Die in INS-1 Zellen nach Stimulation mit Glucose verminderte Expression und Bindungsaktivität von PDX1 (Olson et al., 1998) könnte somit auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Inhibition der Insulin mRNA-Expression nach 24-stündiger und 6-tägiger Inkubation der INS-1 Zellen mit erhöhten Glucosekonzentrationen erklären. Da die mRNA-Expression von IA-2 in INS-1 Zellen im Gegensatz zur Insulin mRNA-Expression durch Glucose stimuliert wurde, scheint eine Beteiligung von PDX1 an der Regulation der IA-2 Genexpression unwahrscheinlich zu sein. Die Promotor-Region des Ratten IA-2-Gens wurde noch nicht kloniert. Dagegen wurden die Promotorregionen des humanem und des murinem IA-2-Gens bereits kloniert und enthalten ebenso wie die Promotor-Region des Insulin-Gens mehrere Sp1-Bindungsstellen sowie A- und E-Boxen (Xie et al., 1998, Saeki et al., 2000). Sp1 oder andere Betazell-Transkriptions-

faktoren wie z.B. Beta-2, HNF1 α , Cdx-3, Lmx-1 oder Isl-1, deren Bindung an A- bzw. E-Boxen im Promotor des Insulin-Gens nachgewiesen wurde (Sander und German, 1997), könnten an der glucose-induzierten Stimulation der IA-2-Genexpression beteiligt sein. Studien zur Identifizierung der an der Regulation der IA-2-Genexpression beteiligten Transkriptionsfaktoren oder Studien zur Charakterisierung des IA-2-Promotors wurden bisher noch nicht durchgeführt. Solche Studien könnten daher durch die vorliegende Arbeit initiiert werden.

Der Einfluss von Glucose auf die Transkription von Genen der Betazellen des endokrinen Pankreas wurde in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Studien untersucht. Erhöhte Glucosekonzentrationen induzieren die Expression von als "immediate early growth response"-Genen bekannten Transkriptionsfaktoren wie z.B. Egr-1, c-fos und junB in primären Inseln und glucose-sensitiven Betazell-Linien (INS-1, MIN6) bereits nach einer Stimulationsdauer von 15-30 Minuten (Josefsen et al., 1999). Dagegen werden die meisten anderen Veränderungen in der Expression von Betazellproteinen erst mehrere Stunden nach Beginn der Glucosestimulation manifestiert. Diese beinhalten neben der bereits erwähnten erhöhten Transkription des Insulin-Gens (Nielsen et al., 1985) eine verstärkte Expression von Genen, die in die Betazell-Funktion, vor allem in die regulierte Insulinsekretion, und in den Glucose-Metabolismus involviert sind (Webb et al., 2000). Nach 24-stündiger Glucosestimulation von primären Inseln oder glucose-sensitiven Betazell-Linien wurde eine erhöhte Expression des Betazell-Glucosetransporters GLUT-2 (Yasuda et al., 1992) sowie von Enzymen des Glucose-Metabolismus wie z.B. Glucokinase (Chen et al., 1994), Acetyl-CoA-Carboxylase (Brun et al., 1993) und Pyruvatkinase (Marie et al., 1993) beschrieben. Diese Veränderungen sind vermutlich das Ergebnis einer Adaptation der Betazellen an erhöhte Glucosekonzentrationen und könnten daher auch *in vivo* bei der für die Glucose-Homöostase notwendigen erhöhten Insulinsekretion nach Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene glucose-induzierte Erhöhung der mRNA-Expression von IA-2 könnte ebenfalls an dieser Adaptation beteiligt sein. Glucose stimuliert ebenfalls die Expression von Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), dem neben IA-2 und Insulin dritten wichtigen diabetes-assoziierten Autoantigen (Björk et al., 1992). Ob diese Abhängigkeit der Expression aller drei wichtigen diabetes-assoziierten Autoantigene (GAD, Insulin, IA-2) vom funktionellen Status der Betazellen bei der Pathogenese eines Typ 1 Diabetes von Bedeutung ist, muss aber in weiteren Studien geklärt werden.

An der glucose-induzierten Insulinsekretion der Betazellen sind "second messengers" wie cAMP oder Diacylglycerol beteiligt, die durch eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) bzw. der Ca²⁺-sensitiven Diacylglycerol-abhängigen Proteinkinase C

(PKC) wirken (Sharp, 1979; Hii et al., 1987). Eine mögliche Beteiligung von cAMP-vermittelten Signaltransduktionssystemen an der Stimulation der IA-2-Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit durch Inkubation von primären Inseln und INS-1 Zellen mit den synthetischen cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX sowie durch Inkubation von INS-1 Zellen mit den Hormonen Glucagon und GLP-1 ("Glucagon-like Peptid 1") untersucht. Sowohl die synthetischen cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX als auch die beiden Hormone Glucagon und GLP-1 stimulierten die mRNA-Expression von IA-2 in primären Inseln und in INS-1 Zellen. Die Proteinexpression von IA-2 war durch Forskolin und IBMX ebenfalls stimuliert (persönliche Kommunikation mit Dr. K. Löbner, London). Diese Ergebnisse identifizieren die cAMP-vermittelte Signaltransduktion als einen Hauptweg bei der Stimulation der IA-2-Expression in Betazellen.

Erhöhte Glucosekonzentrationen bewirken eine Stimulation der cAMP-Produktion in primären Inseln, wodurch die Insulinsekretion gesteigert wird (Sharp, 1979, Sjöholm, 1997). Die synthetischen cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX erhöhen den intrazellulären cAMP-Gehalt durch Aktivierung des Enzyms Adenylat-Cyclase (Forskolin) bzw. durch Inhibition des Enzyms Phosphodiesterase (IBMX). Die Hormone Glucagon und GLP-1 potenzieren die glucose-induzierte Insulinsekretion (Siegel und Creutzfeldt, 1987; Fehmann et al., 1995) durch eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase nach Bindung der Hormone an ihre Rezeptoren. Die Expression von Rezeptoren für Glucagon und GLP-1 wurde in Betazellen nachgewiesen (Thorens, 1992; Kieffer et al., 1996). Beide Rezeptoren gehören zur Familie der Hormonrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die an heterotrimere GTP-bindende G-Proteine gekoppelt sind. Nach Bindung der Hormone an ihre Rezeptoren wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die zu einer gesteigerten Produktion von cAMP durch das Enzym Adenylat-Cyclase führt. Ein erhöhter cAMP-Gehalt in Betazellen wurde nach Stimulation mit Forskolin, Glucagon und GLP-1 beschrieben (Ammon und Muller, 1984; Hussain et al., 2000). Die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) durch den "second messenger" cAMP führt zu einer Phosphorylierung und veränderten Genexpression verschiedener Proteine. Die cAMP-abhängige Proteinphosphorylierung steigert die Insulinsekretion der Betazellen durch eine beschleunigte Bewegung der Insulingranula (Yu et al., 2000). Effekte auf die Genexpression werden z.B. durch die PKA-katalysierte Phosphorylierung des "cAMP response element binding proteins" (CREB) vermittelt, wodurch dessen Dimerisierung und Translokation in den Zellkern induziert wird. Im Zellkern kann CREB die Transkription von Genen durch Bindung an ein sogenanntes "cAMP response element" (CRE) mit der Konsensussequenz TGACGTCA in den Promotoren der Zielgene stimulieren (Comb et al., 1986, Hoeffler et al., 1988). Die cAMP-abhängige Transkription von Genen mit CRE-Elementen wird ebenfalls durch Proteine aus der Familie

der CRE-Modulatoren (CREM) reguliert, die durch alternatives Spleißen des CREM-Gens entstehen und entweder als Aktivatoren oder als Repressoren wirken können (Foulkes und Sassone-Corsi, 1992). Sowohl CREB als auch Transkriptionsfaktoren aus der CREM-Familie wurden in Betazellen nachgewiesen und sind an der cAMP-abhängigen Regulation des Insulin-Gens beteiligt (Oetjen et al., 1994; Inada et al., 1999). Auch die Genexpression des in den Glucose-Metabolismus involvierten Enzyms Glucokinase in Betazellen wird durch einen erhöhten intrazytoplasmatischen cAMP-Spiegel stimuliert (Fernandez-Mejia et al., 2001). Da die Promotoren des humanen und des murinen Gens für IA-2 ein "cAMP response element" (CRE) enthalten (Xie et al., 1998; Saeki et al., 2000), scheint eine Beteiligung von CREB oder von Aktivatoren aus der CREM-Familie an der Stimulation der IA-2-Genexpression wahrscheinlich zu sein. Der genaue Mechanismus der cAMP-abhängigen Stimulation von IA-2 muss allerdings in späteren Promotorstudien geklärt werden, wobei vor allem interessant wäre, ob das "cAMP response element" (CRE) im IA-2-Promotor tatsächlich funktionell aktiv ist.

Die Akkumulation von Insulin im Kulturmedium der Zellen wurde ebenfalls durch alle vier getesteten Reagenzien (Forskolin, IBMX, Glucagon und GLP-1) stimuliert. Die mRNA-Expression von Insulin war nur durch Inkubation mit Forskolin, IBMX und GLP-1 in den INS-1 Zellen signifikant erhöht, während Glucagon in den INS-1 Zellen sowie Forskolin und IBMX in den primären Inseln nur eine geringe nichtsignifikante Steigerung bewirkten. Da die primären Inseln für 48 Stunden mit Forskolin oder IBMX inkubiert wurden, konnte die in anderen Studien beschriebene Stimulation der Insulingenexpression durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen (Philippe und Missotten, 1990) möglicherweise deshalb nicht beobachtet werden, weil die 48-stündige Stimulationsdauer zu lang war. In neuroendokrinen Zellen kann durch cAMP die Expression des "inducible early response repressors" (ICER) induziert werden. ICER inhibiert die Transkription von cAMP-responsiven Genen, die zuvor durch CREB stimuliert wurden, und bewirkt damit eine temporäre Regulation der cAMP-abhängigen Genexpression (Molina et al., 1993; Stehle et al., 1993). In Betazellen wurde eine Induktion von ICER durch Stimulation mit Glucagon, nicht aber durch Stimulation mit GLP-1 beschrieben (Hussain et al., 2000). Diese unterschiedliche Fähigkeit der beiden Hormone zur Induktion von ICER könnte auch miterklären, das in der vorliegenden Arbeit nur bei Inkubation der INS-1 Zellen mit GLP-1, nicht aber mit Glucagon, eine signifikante Stimulation der Insulin mRNA-Expression beobachtet wurde. Eine Stimulation der Insulin mRNA-Expression durch GLP-1 wurde auch in einer anderen Studie beschrieben (Drucker et al., 1987).

Um die Beteiligung von cAMP an der Stimulation der IA-2 mRNA-Expression näher zu untersuchen, wurden die INS-1 Zellen außerdem mit Glucagon und dem cAMP-Antagonisten Rp-cAMPS kokultiviert. Rp-cAMPS ist ein membranpermeables synthetisches cAMP-Analog, das mit cAMP um die Bindung an cAMP-abhängige Proteinkinasen konkurriert. Eine Bindung von Rp-cAMPS an die Proteinkinase A (PKA) führt zu einem Verlust der Phosphorylierungsaktivität dieses Enzyms (Büchler et al., 1988). Nach Kokultivierung der INS-1 Zellen mit Glucagon und Rp-cAMPS war der IA-2 mRNA-Gehalt signifikant niedriger stimuliert als nach Inkubation der INS-1 Zellen mit Glucagon. Dieses Ergebnis zeigt, dass cAMP tatsächlich in die glucagon-induzierte Stimulation der IA-2 mRNA-Expression involviert ist.

Im Gegensatz zum stimulierenden Effekt von Glucose inhibieren einige endogene Faktoren wie z.B. Somatostatin, Adrenalin, Galanin oder Prostaglandin E₂ (PGE₂) die glucose-induzierte Insulinsekretion von Betazellen (Seaquist et al., 1994). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Somatostatin und PGE₂ neben ihrer inhibierenden Wirkung auf die Insulinsekretion auch einen Effekt auf die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin in INS-1 Zellen haben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Somatostatin und PGE₂ auch in INS-1 Zellen die Insulinsekretion inhibieren. Dagegen war der Insulin mRNA-Gehalt der INS-1 Zellen nach Inkubation mit Somatostatin nicht signifikant verändert, während PGE₂ die Insulin mRNA-Expression leicht inhibierte. Weder Somatostatin noch PGE₂ hatten einen signifikanten Effekt auf den IA-2 mRNA-Gehalt der INS-1 Zellen. Die Inhibition der Insulinsekretion war also in beiden Fällen nicht mit einer Inhibition der IA-2 mRNA-Expression verbunden.

Somatostatin-Rezeptoren sind auf Betazellen exprimiert (Mehler et al., 1980). In früheren Studien wurde beschrieben, dass Somatostatin in HIT-Zellen, einer Hamster-Betazell-Linie, zusätzlich zur Sekretion auch die Genexpression von Insulin inhibiert (Zhang et al., 1991, Redmon et al., 1994). Diese inhibierende Wirkung von Somatostatin auf die Genexpression von Insulin in HIT-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit für INS-1 Zellen nicht bestätigt werden. In HIT-Zellen wird die Wirkung von Somatostatin durch G-Proteine (G_{0α}) vermittelt, die an den Somatostatinrezeptor gekoppelt sind. Dadurch verhindert Somatostatin die glucose-induzierte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts (Seaquist et al., 1995). Prostaglandin E₂ (PGE₂) beeinflusst in HIT-Zellen ebenfalls die cAMP-abhängige Signaltransduktion (Robertson et al., 1987). Rezeptoren für PGE₂ (EP3-Rezeptoren) sind sowohl auf HIT-Zellen als auch auf primären Ratten-Inseln exprimiert (Boie et al., 1997; Tran et al., 1999). Sowohl exogenes PGE₂ als auch endogen synthetisiertes PGE₂ inhibieren in HIT-Zellen und in primären Inseln die cAMP-Akkumulation und die Insulinsekretion (Robertson et al., 1987; Turk et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PGE₂

auch in INS-1 Zellen die Insulinsekretion und zusätzlich auch die Insulin mRNA-Expression hemmt.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Expression der diabetes-assoziierten Autoantigens IA-2 in primären Inseln und in der INS-1 Zell-Linie durch Glucose, den wichtigsten metabolischen Stimulus der Insulinsekretion, stimuliert wird. Die synthetischen cAMP-Stimulantien Forskolin und IBMX, und die Hormone Glucagon und GLP-1, die den intrazellulären Gehalt des "second messengers" cAMP steigern und die glucose-induzierte Insulinsekretion potenzieren können, stimulierten ebenfalls die IA-2-Expression. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen somit die Hypothese einer Beteiligung von IA-2 an der regulierten Sekretion von Insulin durch Betazellen des endokrinen Pankreas.

5.2. Die Inhibition der mRNA-Expression von IA-2 durch proinflammatorische Zytokine

Während der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes werden die Inselzellen des Pankreas in der prädiabetischen Phase zunächst von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen und nachfolgend von CD4⁺-und CD8⁺-T-Lymphozyten infiltriert, wie im Tiermodell der NOD-Maus gezeigt wurde (Jansen et al., 1994; Kay et al., 1997). Diese infiltrierenden Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen, unter ihnen die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 β), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferon-gamma (IFN- γ), für die Rezeptoren auf pankreatischen Inseln und Betazell-Linien nachgewiesen wurden (Jafarian-Tehrani et al., 1995; Stephens et al., 1999; Chen et al., 2000). Da proinflammatorische Zytokine neben anderen Wirkungen auch die Expression verschiedener Betazell-Proteine modulieren können (Andersen et al., 1995; Strandell et al., 1995; Chen et al., 1999), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Zytokine ebenfalls einen Einfluss auf die mRNA-Expression des diabetes-assoziierten Autoantigens IA-2 in der INS-1 Zell-Linie haben. Die zytokin-induzierten Veränderungen in der IA-2-Expression wurden außerdem mit Veränderungen in der Sekretion und in der mRNA-Expression von Insulin verglichen.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ inhibierten die mRNA-Expression von IA-2 in Abhängigkeit von der Zytokindosis und von der Zeitdauer der Inkubation, wobei bereits nach 6 Stunden eine signifikante Inhibition beobachtet wurde, die nach 24 und 48 Stunden verstärkt war. Da nach 6-stündiger Inkubation mit den Zytokinen die metabolischen Funktionen der INS-1 Zellen noch nicht beeinträchtigt waren, scheint die Inhibition der IA-2-

Expression unabhängig von den in anderen Studien (Mandrup-Poulsen, 1996; Rabinovitch, 1998) beschriebenen zytotoxischen Wirkungen der Zytokine auf Betazellen zu sein. Nach 24 Stunden Inkubation der INS-1 Zellen mit den Zytokinen war in Übereinstimmung mit diesen Studien auch in der vorliegenden Arbeit eine verminderte metabolische Funktion der Zellen nachweisbar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der mittels der "differential display"-Methode Betazell-Gene identifiziert wurden, die durch IL-1 β reguliert werden, ist ebenfalls eine IL-1 β -induzierte Inhibition der mRNA-Expression von IA-2 beschrieben (Chen et al., 1999). In Übereinstimmung mit anderen Studien (Mandrup-Poulsen, 1996; Dunger et al., 1996; Ling et al., 1998) wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Inhibition der mRNA-Expression und der Sekretion von Insulin nach Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen beobachtet. IL-1 β , TNF- α und IFN- γ inhibieren ebenfalls die mRNA- und Proteinexpression des Enzyms Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) in Ratten-Inseln (Schmidli et al., 1996). Damit wird die Expression aller drei wichtigen diabetes-assoziierten Autoantigene durch die proinflammatorischen Zytokine inhibiert. Ob diese zytokin-induzierte Inhibition der Expression von Autoantigenen pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung eines Typ 1 Diabetes hat, muss in weiteren Studien geklärt werden. Die INS-1 Zellen wurden zusätzlich noch mit zwei anderen Zytokinen, dem Th1-Zytokin IL-2 und dem Th2-Zytokin IL-4, inkubiert. Beide Zytokine beeinflussten die mRNA-Expression von IA-2 nicht signifikant. Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Studie zur Regulation der GAD-Expression, in der beschrieben wurde, dass IL-2 und IL-4 keinen Effekt auf die Expression von GAD in Ratten-Inseln haben (Schmidli et al., 1996).

Bei Inkubation der INS-1 Zellen mit Kombinationen der proinflammatorischen Zytokine (TNF- α + IFN- γ und IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) war die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin am stärksten inhibiert. Die größten Effekte wurden nach 24 Stunden Inkubation der INS-1 Zell-Linie mit der Zytokinkombination IL-1 β + TNF- α + IFN- γ beobachtet, wobei die IA-2 mRNA auf 22% und die Insulin mRNA auf 6% der basalen Werte inhibiert waren. IFN- γ und TNF- α potenzieren die Effekte von IL-1 β , das unter den drei proinflammatorischen Zytokinen die stärksten inhibitorischen Wirkungen auf Betazellen hat und am besten charakterisiert ist. IL-1 β allein oder in Kombination mit IFN- γ und/oder TNF- α inhibiert bei murinen Inseln die Akkumulation von Insulin im Kulturmedium, beeinträchtigt die glucose-induzierte Insulinsekretion und inhibiert die Glucoseoxidation (Eizirik, 1988; Southern et al., 1990; Sandler et al., 1991). Andere *in vitro*-Studien zeigten, dass proinflammatorische Zytokine die morphologische Gestalt von Betazellen verändern (Ling et al., 1993), DNA-Strang-Brüche induzieren sowie Betazelltod durch Apoptose und Nekrose verursachen (Dunger et al., 1996; Delaney et al., 1997, Saldeen, 2000). Die in die inhibitorischen Wirkungen von IL-1 β involvierten Signaltransduktionsmechanismen sind sehr komplex und bisher nur teilweise

aufgeklärt. Als früheste Schritte nach der Bindung von IL-1 β an seinen Rezeptor werden zur Zeit diskutiert: Hydrolyse von Phospholipiden durch non-phosphatidylinositol-Phospholipase C (PLC), Aktivierung der membrangebundenen Sphingomyelinase und nachfolgende Freisetzung von Ceramiden sowie Aktivierung von Pertussistoxin-insensitiven GTP-Bindungsproteinen. Dadurch aktiviert eine Kaskade von Proteinkinasen (z.B. p38 mitogen-activated Proteinkinase (MAPK) und JNK-1), wodurch nachfolgend nukleäre Transkriptionsfaktoren (NF κ B, NF-IL-6, c-fos, c-jun) aktiviert bzw. stimuliert werden und die Expression von IL-1 β -regulierten Genen verändert wird (Mandrup-Poulsen, 1996; Sjöholm, 1998). Die in verschiedenen Studien beschriebenen komplexen IL-1 β -induzierten Veränderungen im Proteinexpressionsprofil von Betazellen betreffen sowohl die Ebene der Transkription als auch der Translation (Chen et al., 1999; Larsen et al., 2001). IL-1 β inhibiert die Expression von betazellspezifischen Proteinen wie z.B. dem Transkriptionsfaktor PDX-1, dem Glucosetransporter GLUT-2, dem Betazell-Hormon Insulin und der Proinsulin-Konvertase PC-2 (Sandler et al., 1987; Ling et al., 2000). Gleichzeitig wird die Expression von unspezifischen Stressproteinen wie z.B. Hämoxxygenase HO-1, Hitzeschockprotein HSP70 und Superoxid-Dismutase MnSOD hochreguliert (Strandell et al., 1995; Ling et al., 2000), wodurch in den Betazellen Prozesse der Zellreparatur und der Abwehr von zytokin-verursachten Zellschädigungen induziert werden. Die zytokin-induzierten Effekte auf die mRNA- und Proteinexpression von Betazellen scheinen eine Veränderung des Betazell-Phänotyps zu reflektieren, die durch eine verminderte Expression von betazellspezifischen Proteinen und eine erhöhte Expression von Stressproteinen charakterisiert ist. Diese Hypothese stimmt mit dem Konzept überein, das proinflammatorische Zytokine den funktionellen Status von Betazellen so verändern können, dass die Betazellen ihre charakteristischen Eigenschaften verlieren, vor allem die Fähigkeit, in Antwort auf erhöhte Glucosekonzentrationen Insulin zu produzieren und zu sezernieren (Ling et al., 1993, 2000). In diesen Kontext ist wahrscheinlich auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene zytokin-induzierte Inhibition der IA-2 mRNA-Expression einzuordnen.

Stickstoffmonoxid (NO) wurde in der vorliegenden Arbeit als ein Mediator der zytokin-induzierten Inhibition der IA-2 mRNA-Expression identifiziert. IL-1 β und TNF- α induzieren in Betazellen nach 3-6 Stunden die Expression des Enzyms induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), das die Produktion von NO aus Arginin katalysiert (Southern et al., 1990). IFN- γ potenziert die durch IL-1 β oder TNF- α induzierte NO-Produktion (Dunger et al., 1996; Heitmeier et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass IL-1 β und in geringerem Umfang TNF- α , nicht aber IFN- γ , zeitabhängig die Produktion von NO in INS-1 Zellen induzieren. Bei Inkubation mit den verwendeten Zytokin-Kombinationen (TNF- α + IFN- γ und IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) war die NO-Produktion der INS-1 Zellen potenziert. Bei Ko-

Inkubation der Zytokinkombination IL-1 β + TNF- α + IFN- γ , die die mRNA-Expression von IA-2 und Insulin am stärksten inhibierte, mit L-NMMA, einem Inhibitor des Enzyms iNOS, war die NO-Produktion der INS-1 Zellen fast vollständig unterdrückt und gleichzeitig die Inhibition der IA-2- und Insulin-Expression abgeschwächt. Außerdem bewirkte der synthetische NO-Donor SNAP ebenfalls eine Inhibition der mRNA-Expression von IA-2 und Insulin. Diese Ergebnisse demonstrieren die Beteiligung von NO an der zytokin-induzierten Inhibition der IA-2- und Insulin-Expression. Da der iNOS-Inhibitor L-NMMA die inhibitorischen Zytokin-Effekte nicht komplett unterdrücken konnte, ist zusätzlich zum Stickstoffmonoxid eine Beteiligung anderer Mediatoren wahrscheinlich. Dies könnten z.B. reaktive Sauerstoffradikale oder Peroxynitrit sein, die ebenfalls als mögliche Mediatoren der Zytokin-Effekte auf Betazellen diskutiert werden (Mandrup-Poulsen, 1996; Rabinovitch et al., 1998). Die Reduktion des intrazellulären Gehalts an cAMP durch IL-1 β (Sjöholm, 1992) könnte die Inhibition der IA-2 mRNA-Expression ebenfalls mitverursachen, da die IA-2 mRNA-Expression durch cAMP-vermittelte Signaltransduktionswege stimuliert wird, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Da IFN- γ in den INS-1 Zellen keine NO-Produktion induzierte, müssen NO-unabhängige Signaltransduktionswege in die IFN- γ -induzierte Inhibition der IA-2 mRNA-Expression involviert sein, die in zukünftigen Studien zu klären sind. Möglicherweise könnten daran die Transkriptionsfaktoren STAT1-1 α ("signal transducer and activator of transcription 1 α ") und IRF-1 ("interferon regulatory factor-1") beteiligt sein, die durch IFN- γ aktiviert bzw. induziert werden und als mögliche Mediatoren der destruktiven Effekte von IFN- γ auf Betazellen diskutiert werden (Karlsen et al., 2000; Suk et al., 2001). Durch erhöhte intrazelluläre NO-Konzentrationen wird ebenfalls die Aktivität von mitochondrialen Enzymen wie der Aconitase sowie die Insulinsekretion inhibiert und die nukleäre DNA geschädigt (Welsh et al., 1991; Fehsel et al., 1993). Eine vor kurzem publizierte Studie demonstrierte, dass sowohl zytokin-induziertes NO als auch NO aus einem synthetischen NO-Donor in neonatalen Ratten-Inseln die Expression einer Reihe von Proteinen verändert, wobei vor allem die Induktion verschiedener Hitzeschockproteine bemerkenswert ist, weil dies einen möglichen protektiven Mechanismus gegen eine NO-vermittelte Zellschädigung darstellen könnte (John et al., 2000).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die mRNA-Expression der Autoantigene IA-2 und Insulin sowie die Sekretion von Insulin in der INS-1 Zell-Linie inhibieren. Die inhibierende Wirkung der Zytokine war potenziert, wenn die INS-1 Zellen mit Zytokin-Kombinationen (TNF- α + IFN- γ bzw. IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) inkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass das lokale Zytokinemilieu in den pankreatischen Inseln während der prädiabetischen Phase die Expression von zwei wichtigen diabetes-assoziierten

Autoantigenen in Betazellen beeinflussen kann. Außerdem wurde Stickstoffmonoxid (NO) als Mediator der zytokin-induzierten Inhibition der IA-2 und Insulin mRNA-Expression identifiziert.

6. Zusammenfassung

IA-2 stellt ein wichtiges Targetprotein der humoralen und zellulären Autoimmunantwort beim Typ 1 Diabetes dar. Während seine Rolle als diabetes-assoziiertes Autoantigen in zahlreichen Studien bereits gut definiert wurde, ist über seine biologische Funktion bisher wenig bekannt. Da IA-2 in den Betazellen der Langerhans'schen Inseln vor allem in den Membranen von insulinsekretorischen Granula lokalisiert ist, wird seit längerem vermutet, dass es in die regulierte Sekretion von Insulin involviert sein könnte.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von metabolischen und hormonellen Faktoren, die die Sekretion von Insulin modulieren, auf die Expression von IA-2 in der INS-1 Betazell-Linie und in primären Langerhans'schen Inselzellen der Ratte untersucht. Um Veränderungen in der Genexpression von IA-2 möglichst sensitiv und zuverlässig detektieren zu können, wurden zwei neuartige RT-PCR Techniken (kompetitive PCR und real-time PCR) etabliert, und ihre Ergebnisse mit einer konservativen Methode (Northern Blot Analyse) verglichen. Die Regulation der IA-2-Genexpression wurde mit Änderungen bei der Sekretion und der Genexpression von Insulin verglichen. Glucose, der wichtigste metabolische Stimulus der Insulinsekretion und -biosynthese, wurde als Stimulator der IA-2 Gen-expression sowohl in primären Inseln als auch in INS-1 Zellen identifiziert. Die mRNA-Expression sowohl von IA-2 als auch von Insulin war nach 48 Stunden Inkubation der primären Inseln mit erhöhten Glucosekonzentrationen (10 mmol/l versus 6 mmol/l Glucose) stimuliert. In INS-1 Zellen wurde dagegen erst nach 6 Tagen Stimulation eine dosis-abhängige Erhöhung der IA-2 mRNA-Expression beobachtet, wobei 21 mmol/l Glucose die IA-2-Expression maximal stimulierten und gleichzeitig paradoxerweise die Insulin-Expression maximal inhibierten. Faktoren, die durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes die Sekretion von Insulin stimulieren, erhöhten ebenfalls die Genexpression von IA-2. IA-2 wurde dabei sowohl durch synthetische cAMP-Stimulantien wie Forskolin und IBMX als auch durch natürliche cAMP-stimulierende Liganden wie die Hormone Glucagon und Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) stimuliert. Eine leichte Erhöhung der IA-2 Expression war bereits nach 6 Stunden Inkubation mit den cAMP-Stimulantien nachweisbar, während die maximale Stimulation von IA-2 nach 24 Stunden Inkubation beobachtet wurde. Faktoren, die die Insulinsekretion hemmen, wie Somatostatin und Prostaglandin E₂ (PGE₂) hatten dagegen keinen Einfluss auf die Expression von IA-2. In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmals nachgewiesen, dass die mRNA-Expression von IA-2 in primären Inseln und in INS-1 Zellen durch Glucose und durch cAMP-abhängige Signaltransduktionswege moduliert wird, die ebenfalls in die Regulation der Insulinsekretion involviert sind. Damit wird die Hypothese einer Beteiligung von IA-2 an der regulierten

Sekretion von Insulin unterstützt. Allerdings waren die Regulation der Insulinsekretion und der mRNA-Expression von IA-2 nicht bei allen untersuchten Faktoren direkt miteinander gekoppelt, was die Beteiligung anderer Regulationsmechanismen, z.B. posttranslationale Modifikationen von IA-2, wahrscheinlich macht.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Zytokinen, die während der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes durch aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten sezerniert werden, auf die Genexpression von IA-2 und Insulin untersucht. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine Interferon- 1β (IL- 1β), Tumornekrosefaktor- 1α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) die mRNA-Expression von IA-2 in INS-1 Zellen dosis- und zeitabhängig inhibieren. Diese Inhibition der IA-2 mRNA-Expression war bereits nach 6 Stunden Inkubation nachweisbar und nach 24 und 48 Stunden verstärkt. Gleichzeitig wurden durch die proinflammatorischen Zytokine auch die Genexpression und die Sekretion von Insulin gehemmt. Die inhibierende Wirkung der proinflammatorischen Zytokine auf die Genexpression von IA-2 und Insulin war durch Kombinationen der Zytokine (TNF- α und IFN- γ bzw. IL- 1β , TNF- α und IFN- γ) potenziert. Als ein Mediator der zytokin-induzierten Inhibition von IA-2- und Insulinexpression wurde das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass auch chemisch durch einen synthetischen NO-Donor generiertes Stickstoffmonoxid die Expression von IA-2 und Insulin inhibieren kann. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass das lokale, in den pankreatischen Inseln während der prädiabetischen Phase bestehende Zytokinmilieu, die Expression von zwei wichtigen diabetes-assoziierten Autoantigenen in Betazellen beeinflussen kann.

7. Literaturverzeichnis

Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P et al.: Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 97:2772-2783, 1996

American Diabetes Association: American Diabetes Association:clinical practice recommendations. *Diabetes Care.* 20:S1-S70, 1997

Ammon HP, Muller AB: Effect of forskolin on islet cyclic AMP, insulin secretion, blood glucose and intravenous glucose tolerance in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 326:364-367, 1984

Andersen HU, Larsen PM, Fey SJ, Karlsten AE, Mandrup-Poulsen T, Nerup J: Two-dimensional gel electrophoresis of rat islet proteins. Interleukin 1 beta-induced changes in protein expression are reduced by L-arginine depletion and nicotinamide. *Diabetes* 44: 400-407, 1995

Arden SD, Roep BO, Neophytou PI, Usac EF, Duinkerken G, de Vries RR, Hutton JC: Imogen 38: a novel 38-kD islet mitochondrial autoantigen recognized by T cells from a newly diagnosed type 1 diabetic patient. *J Clin Invest.* 97:551-561, 1996

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology.* 130: 167-178, 1992

Ashcroft FM, Ashcroft SJH: *Insulin: Molecular Biology to Pathology.* New York, Oxford University Press, 1992

Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, Erlander MG, Tobin AJ, Maclaren NK: Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 339:458-459, 1992

Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK: Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 91:350-356, 1993

Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 94:2125-2129, 1994

Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 358:221-219, 2001

Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA: Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:7907-7911, 1984

Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15: 516-542, 1994

Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature.* 298:167-169, 1982

Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P, Camilli PD: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature.* 1990 347:151-156, 1990

- Bergot MO, Diaz-Guerra MJ, Puzenat N, Raymondjean M, Kahn A:** Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res.* 20:1871-1877, 1992
- Björk E, Kampe O, Karlsson FA, Pipeleers DG, Andersson A, Hellerstrom C, Eizirik DL:** Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:1574-1576, 1992
- Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M:** Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 340:227-241, 1997
- Boisclair YR, Brown AL, Casola S, Rechler MM:** Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat. *J Biol Chem.* 268:24892-24901, 1993
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, et al.:** Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia.* 38:816-822, 1995
- Brun T, Roche E, Kim KH, Prentki M:** Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem.* 268:18905-18911, 1993
- Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ:** Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:2115-2119, 1992
- Büchler W, Walter U, Jastorff B, Lohmann SM:** Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is essential for cAMP-mediated mammalian gene expression. *FEBS Lett.* 228:27-32, 1988
- Bustin SA:** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25:169-193, 2000
- Butler MH, Solimena M, Dirx R Jr, Hayday A, De Camilli P:** Identification of a dominant epitope of glutamic acid decarboxylase (GAD-65) recognized by autoantibodies in stiff-man syndrome. *J Exp Med.* 178:2097-2106, 1993
- Cai T, Krause MW, Odenwald WF, Toyama R, Notkins AL:** The IA-2 gene family: homologs in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and zebrafish. *Diabetologia.* 44:81-88, 2001
- Cailleau C, Diu-Hercend A, Ruuth E, Westwood R, Carnaud C:** Treatment with neutralizing antibodies specific for IL-1beta prevents cyclophosphamide-induced diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes.* 46:937-940, 1997
- Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC:** IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol.* 141:2325-2329, 1988
- Campbell IL, Oxbrow L, West J, Harrison LC:** Regulation of MHC protein expression in pancreatic beta-cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol.* 2:101-107, 1988
- Campbell IL, Cutri A, Wilkinson D, Boyd AW, Harrison LC:** Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:4282-4286, 1989
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B:** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:3666-3670, 1975
- Castano L, Russo E, Zhou L, Lipas MA, Eisenbarth GS:** Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 73:1197-1201, 1991

- Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL:** TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 6:399-406, 1994
- Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL:** Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest*. 94:1616-1620, 1994
- Chen G, Hohmeier HE, Gasa R, Tran VV, Newgard CB:** Selection of insulinoma cell lines with resistance to interleukin-1beta- and gamma-interferon-induced cytotoxicity. *Diabetes*. 49:562-570, 2000
- Chen MC, Schuit F, Eizirik DL:** Identification of IL-1beta-induced messenger RNAs in rat pancreatic beta cells by differential display of messenger RNA. *Diabetologia*. 42:1199-1203, 1999
- Christie MR, Vohra G, Champagne P, Daneman D, Delovitch TL:** Distinct antibody specificities to a 64-kD islet cell antigen in type 1 diabetes as revealed by trypsin treatment. *J Exp Med*. 172: 789-794, 1990
- Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM:** A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*. 323:353-356, 1986
- Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, Kanagawa O, Unanue ER:** Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:8992-8995, 1993
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG:** Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 3:207-212, 1991
- Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D:** Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol*. 25:1056-1062, 1995
- Daniel S, Zhang S, DePaoli-Roach AA, Kim KH:** Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene. *J Biol Chem*. 271:14692-14697, 1996
- Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, Bach JF:** Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun*. 4:237-248, 1991
- Delaney CA, Green MH, Lowe JE, Green IC:** Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 beta in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. *FEBS Lett*. 333:291-295, 1993
- Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL:** Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*. 138:2610-2614, 1997
- Diaz-Guerra MJ, Bergot MO, Martinez A, Cuif MH, Kahn A, Raymondjean M:** Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex. *Mol Cell Biol*. 13: 7725-7733, 1993
- Diez J, Park Y, Zeller M, Brown D, Garza D, Ricordi C, Hutton J, Eisenbarth GS, Pugliese A:** Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes*. 50:895-900, 2001
- Dirkx R Jr, Hermel JM, Rabin DU, Solimena M:** ICA 512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein, is concentrated in neurosecretory granule membranes. *Adv Pharmacol*. 42:243-246, 1998
- Dotta F, Dionisi S, Viglietta V, Tiberti C, Matteoli MC, Cervoni M, Bizzarri C, Marietti G, Testi M, Multari G, Lucentini L, Di Mario U:** T-cell mediated autoimmunity to the insulinoma-associated protein 2 islet tyrosine phosphatase in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 141:272-278, 1999

- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF:** Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:3434-3438, 1987
- Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA, Lowe JE, Green MH, Bone AJ, Green IC:** Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. Extent of nitric oxide involvement. *Diabetes.* 45:183-189, 1996
- Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG:** Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes.* 45:795-800, 1996
- Eizirik DL:** Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism of glucose is potentiated by tumor necrosis factor. *Acta Endocrinol (Copenh).* 119:321-325, 1988
- Ellis TM, Atkinson MA:** The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med.* 2:148-153, 1996
- Ellis TM, Schatz DA, Ottendorfer EW, Lan MS, Wasserfall C, Salisbury PJ, She JX, Notkins AL, Maclaren NK, Atkinson MA:** The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. *Diabetes.* 47:566-569, 1998
- Fehmann HC, Hering BJ, Wolf MJ, Brandhorst H, Brandhorst D, Bretzel RG, Federlin K, Goke B:** The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets. *Pancreas.* 11:196-200, 1995
- Fehsel K, Jalowy A, Qi S, Burkart V, Hartmann B, Kolb H:** Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes.* 42: 496-500, 1993
- Fernandez-Mejia C, Vega-Allende J, Rojas-Ochoa A, Rodriguez-Dorantes M, Romero-Navarro G et al.:** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increases pancreatic glucokinase activity and gene expression. *Endocrinology.* 142:1448-1452, 2001
- Foulkes NS, Sassone-Corsi P:** More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell.* 68:411-414, 1992
- Fowell D, Mason D:** Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med.* 177:627-636, 1993
- Genovese S, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Benazzi E, Bosi E, Chiumello G, Bonifacio E:** Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia.* 39:1223-1226, 1996
- German MS, Wang J:** The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol.* 14:4067-4075, 1994
- Gillis S, Mizel SB:** T-Cell lymphoma model for the analysis of interleukin 1-mediated T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:1133-1137, 1981
- Girard J, Ferre P, Fougelle F:** Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr.* 17:325-352, 1997
- Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG:** IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia.* 40:95-99, 1997
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR:** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126: 131-138, 1982
- Green EA, Eynon EE, Flavell RA:** Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity.* 9:733-743, 1998

- Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA Jr, Flavell RA:** Local expression of transgene encoded TNF alpha in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med.* 184:1963-1974, 1996
- Grove DS, Mastro AM:** Differential activation and inhibition of lymphocyte proliferation by phorbol esters, mezerein, teleocidin, and okadaic acid. *Cancer Res.* 51:82-88, 1991
- Hagopian WA, Michelsen B, Karlsten AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark A:** Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes.* 42:631-636, 1993
- Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpurua HJ, Schmidli RS, Colman PG, Tait BD, Cram DS:** Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 341:1365-1369, 1993
- Hatfield EC, Hawkes CJ, Payton MA, Christie MR:** Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia.* 40:1327-1333, 1997
- Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, Leslie RD:** Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes.* 46:1270-1275, 1997
- Hawkes CJ, Schloot NC, Marks J, Willemsen SJ, Drijfhout JW, Mayer EK, Christie MR, Roep BO:** T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. *Diabetes.* 49:356-366, 2000
- Hedekov CJ:** Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev.* 60:442-509, 1980
- Heitmeier MR, Scarim AL, Corbett JA:** Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J Biol Chem.* 272:13697-13704, 1997
- Held W, MacDonald HR, Weissman IL, Hess MW, Mueller C:** Genes encoding tumor necrosis factor alpha and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2239-2243, 1990
- Henikoff S:** Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene.* 28:351-359, 1984
- Hermel JM, Dirx R Jr, Solimena M:** Post-translational modifications of ICA512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules. *Eur J Neurosci.* 11:2609-2620, 1999
- Heurtier AH, Boitard C:** T-cell regulation in murine and human autoimmune diabetes: the role of TH1 and TH2 cells. *Diabetes Metab.* 23:377-385, 1997
- Hii CS, Jones PM, Persaud SJ, Howell SL:** A re-assessment of the role of protein kinase C in glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem J.* 246:489-493, 1987
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF:** Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science.* 242:1430-1433, 1988
- Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB:** Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta- induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest.* 101: 1811-1820, 1998
- Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA:** Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 45:812-817, 1996
- Hussain MA, Daniel PB, Habener JF:** Glucagon stimulates expression of the inducible cAMP early repressor and suppresses insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 49:1681-1690, 2000

- Inada A, Someya Y, Yamada Y, Ihara Y, Kubota A, Ban N, Watanabe R, Tsuda K, Seino Y:** The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID. *J Biol Chem.* 274:21095-21103, 1999
- Jafarian-Tehrani M, Amrani A, Homo-Delarche F, Marquette C, Dardenne M, Haour F:** Localization and characterization of interleukin-1 receptors in the islets of Langerhans from control and nonobese diabetic mice. *Endocrinology.* 136:609-613, 1995
- Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA:** Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes.* 43:667-675, 1994
- John NE, Andersen HU, Fey SJ, Larsen PM, Roepstorff P, Larsen MR, Pociot F, Karlens AE, Nerup J, Green IC, Mandrup-Poulsen T:** Cytokine- or chemically derived nitric oxide alters the expression of proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis in neonatal rat islets of Langerhans. *Diabetes.* 49:1819-1829, 2000
- Josefsen K, Sorensen LR, Buschard K, Birkenbach M:** Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 42:195-203, 1999
- Kagi D, Ho A, Odermatt B, Zakarian A, Ohashi PS, Mak TW:** TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. *J Immunol.* 162:4598-4605, 1999
- Karlens AE, Pavlovic D, Nielsen K, Jensen J, Andersen HU, Pociot F, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL, Nerup J:** Interferon-gamma induces interleukin-1 converting enzyme expression in pancreatic islets by an interferon regulatory factor-1-dependent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:830-836, 2000
- Katz JD, Benoist C, Mathis D:** T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science.* 268:1185-1188, 1995
- Kawasaki E, Yu L, Rewers MJ, Hutton JC, Eisenbarth GS:** Definition of multiple ICA512/phogrin autoantibody epitopes and detection of intramolecular epitope spreading in relatives of patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 47:733-742, 1998
- Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE:** CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol.* 148:320-327, 1997
- Kieffer TJ, Heller RS, Unson CG, Weir GC, Habener JF:** Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology.* 137:5119-5125, 1996
- Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA:** LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res.* 59:3171-3174, 1999
- Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M:** Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest.* 101:327-336, 1998
- Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER:** Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:1204-1208, 1985
- Lampasona V, Bearzatto M, Genovese S, Bosi E, Ferrari M, Bonifacio E:** Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen. *J Immunol.* 157:2707-2711, 1996
- Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL:** Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol.* 13:505-514, 1994
- Lan MS, Modi WS, Xie H, Notkins AL:** Assignment of the IA-2 gene encoding an autoantigen in IDDM to chromosome 2q35. *Diabetologia.* 39:1001-1002, 1996

- Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL:** IA-2, a transmembrane protein of the tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6367-6370, 1996
- Larsen PM, Fey SJ, Larsen MR, Nawrocki A, Andersen HU, Kahler H, Heilmann C, Voss MC, Roepstorff P, Pociot F, Karlsen AE, Nerup J:** Proteome analysis of interleukin-1beta--induced changes in protein expression in rat islets of Langerhans. *Diabetes*. 50:1056-1063, 2001
- Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL:** Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 42:3-14, 1999
- Ling Z, In't Veld PA, Pipeleers DG:** Interaction of interleukin-1 with islet beta-cells. Distinction between indirect, aspecific cytotoxicity and direct, specific functional suppression. *Diabetes*. 42:56-65, 1993
- Ling Z, Chen MC, Smismans A, Pavlovic D, Schuit F, Eizirik DL, Pipeleers DG:** Intercellular differences in interleukin 1beta-induced suppression of insulin synthesis and stimulation of noninsulin protein synthesis by rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 139:1540-1545, 1998
- Ling Z, Van de Casteele M, Eizirik DL, Pipeleers DG:** Interleukin-1beta-induced alteration in a beta-cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes*. 49: 340-345, 2000
- Löffler G, Petrides PE:** *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 6.Auflage: 788-791, 1998
- Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS:** Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:2307-2311, 1996
- Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K:** Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 274:1011-1016, 1999
- Magistrelli G, Toma S, Isacchi A:** Substitution of two variant residues in the protein tyrosine phosphatase-like PTP35/IA-2 sequence reconstitutes catalytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 227:581-588, 1996
- Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nielsen JH, Bendixen G, Nerup J:** Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy*. 40:424-429, 1985
- Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH:** Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia*. 29:63-67, 1986
- Mandrup-Poulsen T:** The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 39:1005-1029, 1996
- Marie S, Diaz-Guerra MJ, Miquerol L, Kahn A, Iynedjian PB:** The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic beta-cell type. *J Biol Chem*. 268:23881-23890, 1993
- Martin R, Hoover C, Grimme S, Grogan C, Holtke J, Kessler C:** A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *Biotechniques*. 9:762-768, 1990
- Martin S, Kardorf J, Schulte B, Lampeter EF, Gries FA, Melchers I, Wagner R, Bertrams J, Roep BO, Pflutzner A:** Autoantibodies to the islet antigen ICA69 occur in IDDM and in rheumatoid arthritis. *Diabetologia*. 38:351-355, 1995
- Mehler PS, Sussman AL, Maman A, Leitner JW, Sussman KE:** Role of insulin secretagogues in the regulation of somatostatin binding by isolated rat islets. *J Clin Invest*. 66:1334-1338, 1980

- Mellor H, Parker PJ:** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 332:281-292, 1998
- Merika M, Orkin SH:** DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol.* 13:3999-4010, 1993
- Michalik M, Erecinska M:** GABA in pancreatic islets: metabolism and function. *Biochem Pharmacol.* 44:1-9, 1992
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P:** Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell.* 75:875-886, 1993
- Morgenthaler NG, Seissler J, Achenbach P, Glawe D, Payton M, Meinck HM, Christie MR, Scherbaum WA:** Antibodies to the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 are highly associated with IDDM, but not with autoimmune endocrine diseases or stiff man syndrome. *Autoimmunity.* 25:203-211, 1997
- Mullis KB, Faloona F:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350, 1987
- Nam HJ, Poy F, Krueger NX, Saito H, Frederick CA:** Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell.* 97:449-457, 1999
- Nicoletti F, Zaccone P, Di Marco R, Di Mauro M, Magro G, Grasso S, Mughini L, Meroni P, Garotta G:** The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-gamma receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Endocrinology.* 137:5567-5575, 1996
- Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF:** Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem.* 260:13585-13589, 1985
- Notkins AL, Lan MS, Leslie RD:** IA-2 and IA-2beta: the immune response in IDDM. *Diabetes Metab Rev.* 14: 85-93, 1998
- Oetjen E, Diedrich T, Eggers A, Eckert B, Knepel W:** Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem.* 269:27036-27044, 1994
- Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP:** Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest.* 92:514-519, 1993
- Olson LK, Qian J, Poitout V:** Glucose rapidly and reversibly decreases INS-1 cell insulin gene transcription via decrements in STF-1 and C1 activator transcription factor activity. *Mol Endocrinol.* 12:207-219, 1998
- Ort T, Maksimova E, Dirkx R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner SC, Solimena M:** The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol.* 79:621-630, 2000
- Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB:** The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature.* 286:82-84, 1980
- Ozawa Y, Kasuga A, Nomaguchi H, Maruyama T, Kasatani T, Shimada A, Takei I, Miyazaki J, Saruta T:** Detection of autoantibodies to the pancreatic islet heat shock protein 60 in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun.* 9:517-524, 1996
- Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR:** Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest.* 96:1506-1511, 1995

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 312:724-729, 1984

Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M: Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol*. 71:169-175, 1994

Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD: 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*. 91:10465-10469, 1994

Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, Serup P: Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett*. 431:362-366, 1998

Pfaffl M: Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology. *Biochemica* 3:13-16, 2000

Philippe J, Missotten M: Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem*. 265:1465-1469, 1990

Pietro Paolo M, Castano L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, Martin S, Martin A, Powers AC, et al.: Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *J Clin Invest*. 92:359-371, 1993

Platzer C, Ode-Hakim S, Reinke P, Docke WD, Ewert R, Volk HD: Quantitative PCR analysis of cytokine transcription patterns in peripheral mononuclear cells after anti-CD3 rejection therapy using two novel multispecific competitor fragments. *Transplantation*. 58:264-268, 1994

Poitout V, Olson LK, Robertson RP: Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest*. 97:1041-1046, 1996

Portois L, Maget B, Tastenoy M, Perret J, Svoboda M: Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem*. 274:8181-8190, 1999

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietro Paolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD: The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDMM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. 15:293-297, 1997

Pugliese A, Brown D, Garza D, Murchison D, Zeller M, Redondo M, Diez J, Eisenbarth GS, Patel DD, Ricordi C: Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs. *J Clin Invest*. 107:555-564, 2001

Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA: Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. *Diabetes* 41: 183-186, 1992

Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, et al.: Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 152: 3183-3187, 1994

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF: IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 154:4874-4882, 1995

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, El-Sheikh A, Sorensen O, Power RF: Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of Th1 cytokines correlates with beta-cell destructive insulinitis and IDDM. *Diabetes*. 45:749-754, 1996

- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC:** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS- expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology*. 137:2093-2099, 1996
- Rabinovitch A:** An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 14:129-151, 1998
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL:** Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. 55:1139-1149, 1998
- Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL:** Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 178:87-99, 1993
- Redmon JB, Towle HC, Robertson RP:** Regulation of human insulin gene transcription by glucose, epinephrine, and somatostatin. *Diabetes*. 43:546-551, 1994
- Richter W, Shi Y, Baekkeskov S:** Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2832-2836, 1993
- Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H:** Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem*. 259:6790-6797, 1984
- Roberts C, Roberts GA, Lobner K, Bearzatto M, Clark A, Bonifacio E, Christie MR:** Expression of the protein tyrosine phosphatase-like protein ia-2 during pancreatic islet development. *J Histochem Cytochem*. 49:767-776, 2001
- Robertson RP, Olson LK, Zhang HJ:** Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes*. 43:1085-1089, 1994
- Roep BO, Duinkerken G, Schreuder GM, Kolb H, de Vries RR, Martin S:** HLA-associated inverse correlation between T cell and antibody responsiveness to islet autoantigen in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 26:1285-1289, 1996
- Roll U, Turck CW, Gitelman SE, Rosenthal SM, Nolte MS, Masharani U, Ziegler AG, Baekkeskov S:** Peptide mapping and characterisation of glycation patterns of the glima 38 antigen recognised by autoantibodies in Type I diabetic patients. *Diabetologia*. 43:598-608, 2000
- Saeki K, Xie J, Notkins AL:** Genomic structure of mouse IA-2: comparison with its human homologue. *Diabetologia*. 43:1429-1434, 2000
- Saldeen J:** Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology*. 141:2003-2010, 2000
- Saldeen J, Sandler S, Bendtzen K, Welsh N:** Liposome-mediated transfer of IL-1 receptor antagonist gene to dispersed islet cells does not prevent recurrence of disease in syngeneically transplanted NOD mice. *Cytokine*. 12:405-408, 2000
- Sander M, German MS:** The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med*. 75:327-340, 1997
- Sandler S, Andersson A, Hellerstrom C:** Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis, and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 121:1424-1431, 1987
- Sandler S, Eizirik DL, Svensson C, Strandell E, Welsh M, Welsh N:** Biochemical and molecular actions of interleukin-1 on pancreatic beta-cells. *Autoimmunity* 10: 241-253, 1991
- Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T:** Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*. 346:844-847, 1990

Scherbaum WA, Lauterbach KW, Joost HG (Herausgeber): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. 2001

Schmidli RS, Faulkner-Jones BE, Harrison LC, James RF, DeAizpurua HJ: Cytokine regulation of glutamate decarboxylase biosynthesis in isolated rat islets of Langerhans. *Biochem J.* 317 :713-719, 1996

Scott DK, O'Doherty RM, Stafford JM, Newgard CB, Granner DK: The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. *J Biol Chem.* 273:24145-24151, 1998

Seaquist ER, Walseth TF, Redmon JB, Robertson RP: G-protein regulation of insulin secretion. *J Lab Clin Med.* 123:338-345, 1994

Seaquist ER, Armstrong MB, Gettys TW, Walseth TF: Somatostatin selectively couples to G(o) alpha in HIT-T15 cells. *Diabetes.* 44:85-89, 1995

Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, Glawe D, Lampeter EF, Payton M, Christie M, Scherbaum WA: Combined screening for antibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with Type 1 diabetes. *Diabetologia* 39: 1351-1356, 1996

Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA: Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia* 41: 891-897, 1998

Seissler J, Schott M, Morgenthaler NG, Scherbaum WA: Mapping of novel autoreactive epitopes of the diabetes-associated autoantigen IA-2. *Clin Exp Immunol.* 122:157-163, 2000

Seto E, Shi Y, Shenk T: YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature.* 354:241-245, 1991

Sharp GW: The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia.* 16:287-296, 1979

Siegel EG, Creutzfeldt W: Effect of low concentrations of glucagon on insulin release and cyclic AMP content in isolated rat islets. *Metabolism.* 36:953-957, 1987

Sjöholm A: Differential effects of cytokines on long-term mitogenic and secretory responses of fetal rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol.* 263:C114-120, 1992

Sjöholm A: Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes.* 46:1141-1147, 1997

Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J, Efstratiadis A: RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol.* 5:2090-2103, 1985

Solimena M, Dirkx R Jr, Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, Caron L, Rabin DU: ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J.* 15:2102-2114, 1996

Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Dominguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R: Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol.* 161:5918-5929, 1998

Southern C, Schulster D, Green IC: Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.* 276: 42-44, 1990

- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P:** Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*. 365:314-320, 1993
- Steinbrenner H, Lohmann T, Ostendorf B, Scherbaum WA, Seissler J:** Autoantibodies to ICA12 (SOX-13) are not specific for Type I diabetes. *Diabetologia*. 43:1381-1384, 2000
- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC:** Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet*. 19:463-484, 1985
- Stephens LA, Thomas HE, Ming L, Grell M, Darwiche R, Volodin L, Kay TW:** Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology*. 140:3219-3227, 1999
- Strandell E, Buschard K, Saldeen J, Welsh N:** Interleukin-1 beta induces the expression of hsp70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islet beta-cells, but not in alpha-cells. *Immunol Lett*. 48:145-148, 1995
- Suk K, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, Shong M, Lee MS:** IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol*. 166:4481-4489, 2001
- Thorens B:** Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:8641-8645, 1992
- Tian YM, Urquidi V, Ashcroft SJ:** Protein kinase C in beta-cells: expression of multiple isoforms and involvement in cholinergic stimulation of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 119:185-193, 1996
- Tran PO, Gleason CE, Poitout V, Robertson RP:** Prostaglandin E(2) mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 274:31245-31248, 1999
- Trembleau S, Penna G, Gregori S, Magistrelli G, Isacchi A, Adorini L:** Early Th1 response in unprimed nonobese diabetic mice to the tyrosine phosphatase-like insulinoma-associated protein 2, an autoantigen in type 1 diabetes. *J Immunol*. 165:6748-6755, 2000
- Tun RY, Smith MD, Lo SS, Rook GA, Lydyard P, Leslie RD:** Antibodies to heat shock protein 65 kD in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 11:66-70, 1994
- Turk J, Hughes JH, Easom RA, Wolf BA, Scharp DW, Lacy PE, McDaniel ML:** Arachidonic acid metabolism and insulin secretion by isolated human pancreatic islets. *Diabetes*. 37:992-996, 1988
- Vardi P, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS:** Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*. 11:736-739, 1988
- Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A:** Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem*. 275:31555-31558, 2000
- Velloso LA, Kampe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlsson FA:** Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest*. 91:2084-2090, 1993
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase PH, Eisenbarth GS:** Prediction of type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of Insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-933, 1996
- Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C:** Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol*. 10:1327-1334, 1996

- Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D:** Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13844-13849, 1997
- Wasmeier C, Hutton JC:** Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem.* 271:18161-18170, 1996.
- Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K et al.:** PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes.* 45:1826-1831, 1996
- Webb GC, Akbar MS, Zhao C, Steiner DF:** Expression profiling of pancreatic beta cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5773-5778, 2000
- Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D:** Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. *J Autoimmun.* 7:833-843, 1994
- Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S:** Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology.* 129: 3167-3173, 1991
- Wender PA, Koehler KF, Sharkey NA, Dell'Aquila ML, Blumberg PM:** Analysis of the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C as a guide to the rational design of new classes of analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4214-4218, 1986
- Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM:** Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol.* 23:305-312, 1986
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ:** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 22: 176-181, 1997
- Wiest-Ladenburger U, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Boehm BO, Richter W:** Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA-2 autoantibodies in Type 1 diabetes can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 46: 5655-5671, 1997
- Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA Jr:** Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med.* 5:1026-1031, 1999
- Xie J, Zhang B, Lan MS, Notkins AL:** Genomic structure and promoter sequence of the insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2 (PTPRN). *Genomics.* 54:338-343, 1998
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR:** Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature.* 334:494-498, 1988
- Yang XD, Tisch R, Singer SM, Cao ZA, Liblau RS, Schreiber RD, McDevitt HO:** Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med.* 180:995-1004, 1994
- Yasuda K, Yamada Y, Inagaki N, Yano H, Okamoto Y, Tsuji K, Fukumoto H, Imura H, Seino S, Seino Y:** Expression of GLUT1 and GLUT2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes.* 41:76-81, 1992
- Yki-Jarvinen H:** Glucose toxicity. *Endocr Rev.* 13:415-431, 1992
- Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS:** Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1701-1706, 2000

Yu W, Niwa T, Fukasawa T, Hidaka H, Senda T, Sasaki Y, Niki I: Synergism of protein kinase A, protein kinase C, and myosin light-chain kinase in the secretory cascade of the pancreatic beta-cell. *Diabetes*. 49:945-952, 2000

Zhang BW, Lan MS, Notkins AL: Autoantibodies to IA-2 in IDDM: Locations of major antigenic determinants. *Diabetes*. 46: 40-43, 1997

Zhang HJ, Redmon JB, Andresen JM, Robertson RP: Somatostatin and epinephrine decrease insulin messenger ribonucleic acid in HIT cells through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Endocrinology*. 129:2409-2414, 1991

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
Ala	Alanin
APC	antigen presenting cell
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BB-Ratte	Biobreeding-Ratte
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-[5'-chloro] tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat
DDFI	Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Dinatriumethylendiamintetraacetat-dihydrat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 kg × m/s ²)
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1

GLUT-2	Glucosetransporter 2
h	Stunde
HO-1	Hämoxygenase 1
Hsp 65	Hitzeschockprotein 65
IA-2	Inselzell-Antigen 2
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICA 69	Islet cell antigen 69
ICER	inducible early response repressor
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
INS-1	Insulinoma Zell-Linie 1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRAP	IL-1 Rezeptor Antagonist
IRF-1	interferon regulatory factor 1
^{125}J	radioaktiv markiertes Jod
J	Joule
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LADA	latenter autoimmuner Diabetes bei Erwachsenen
LB	Lennox L Broth
m	Meter
m	milli- (10^{-3})
μ	mikro- (10^{-6})
MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
min	Minute
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MOPS	3'-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
n	nano- (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Di-Nucleotid-(Phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NMMA	N ^G -monomethyl-L-arginin-monoacetat

NO	Stickstoffmonoxid
NOD-Maus	Non-obese-diabetic Maus
NTF	aminoterminales Fragment
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC-2	Proinsulin-Konvertase 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDX1	pancreatic duodenum homoeobox protein 1
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SEM	Standard error of the mean
SLMV	synaptic-like microvesikel
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
Sox-13	SRY-related HMG box protein 13
SSC	Sodium chloride/sodium citrate
STAT-1 α	signal transducer and activator of transcription 1 α
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF β 1	Transforming growth factor beta1
Th1(2)-Lymphozyten	T-Helfer 1 (2)-Lymphozyten
TMF	Transmembranfragment
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Units (Einheiten)
USF	upstream stimulatory factor
UV	Ultraviolett
V	Volt
VK	Variationskoeffizient
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Holger Steinbrenner
Geburtsdatum: 31.10.1967
Geburtsort: Gotha / Thüringen (DDR)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Wohnort: Eisenstrasse 71, 40227 Düsseldorf

Ausbildung

1974 –1984 Polytechnische Oberschule in Gotha
1984 –1986 Erweiterte Oberschule (Gymnasium) in Gotha
1986 –1989 Militärdienst in der Nationalen Volksarmee (NVA) der DDR
1989 –1995 Studium der Biochemie an der Universität Leipzig
(Hauptfächer: Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie)
(1993) Auslandssemester am Institut Nationale des Sciences Ap-
pliqueés (INSA) in Lyon (Frankreich)

Wissenschaftlicher Werdegang

1995-1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Leipzig
1997-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Diabetes-For-
schungsinstitut (DDFI) Düsseldorf
(Arbeit an der Dissertation unter der Leitung von Prof. W.A.
Scherbaum)
seit 01.10.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische
Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10. Publikationen

Originalarbeiten

Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA: Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia*. 41: 891-897, 1998

Morgenthaler NG, Hodak K, Seissler J, Steinbrenner H, Pampel I, Gupta M, McGregor AM, Scherbaum WA, Banga JP: Direct binding of thyrotropin receptor autoantibody to in vitro translated thyrotropin receptor: a comparison to radioreceptor assay and thyroid stimulating bioassay. *Thyroid*. 9: 466-475, 1999

Seissler J, Schott M, Steinbrenner H, Peterson P, Scherbaum WA: Autoantibodies to adrenal cytochrome P450 antigens in isolated Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndrome type II. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 107: 208-213, 1999

Seissler J, Nguyen TBT, Aust G, Steinbrenner H, Scherbaum WA: Regulation of the diabetes-associated autoantigen IA-2 in INS-1 pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 49: 1137-1141, 2000

Steinbrenner H, Lohmann T, Ostendorf B, Scherbaum WA, Seissler J: Autoantibodies to ICA12 (SOX-13) are not specific for type I diabetes. *Diabetologia*. 43:1381-1384, 2000

Lobner K, Steinbrenner H, Roberts GA, Ling Z, Huang GC, Piquer S, Pipeleers DG, Seissler J, Christie MR: Different regulated expression of the tyrosine phosphatase-like proteins IA-2 and phogrin by glucose and insulin in pancreatic islets: relationship to development of insulin secretory responses in early life. *Diabetes* 51: 2982-2988, 2002

Steinbrenner H, Nguyen TB, Wohlrab U, Scherbaum WA, Seissler J: Effect of Proinflammatory Cytokines on Gene Expression of the Diabetes-Associated Autoantigen IA-2 in INS-1 Cells. *Endocrinology* 143: 3839-3845, 2002

Abstracts für Poster und Vorträge

Steinbrenner H, Schott M, Glawe D, Scherbaum WA, Seissler J: Charakterisierung von immunreaktiven Epitopen der Autoantigene IA2 und IA2 β beim Typ 1 Diabetes (Vortrag beim DDG-Kongress 1998)

Steinbrenner H, Schott M, Scherbaum WA, Seissler J: Characterisation of autoreactive Epitopes of IA-2 and IA-2 β in type 1 Diabetes (Poster beim EASD-Kongress 1998)

Nguyen TBT, Steinbrenner H, Scherbaum WA, Seissler J: Regulation der Expression des Autoantigens IA-2 in INS-1 Insulinomazellen (Vortrag beim DDG-Kongress in 1999)

Steinbrenner H, Scherbaum WA, Seissler J: Autoantibodies against SOX-13 are only slightly increased in patients with newly diagnosed type 1 diabetes (Poster beim DDG-Kongress 2000)

Steinbrenner H, Nguyen TBT, Scherbaum WA, Seissler J: Proinflammatorische Zytokine inhibieren die Expression des Autoantigens IA-2 (Vortrag beim DDG-Kongress 2001)

Löbner K, Steinbrenner H, Roberts GA, Huang GC, E. Bonifacio E, Seissler J, Christie MR: The PTP like Molecule IA-2 as a Model for Paracrine Regulation by Insulin (Vortrag beim EASD-Kongress 2001)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, den 27. Januar 2002