

Aus der klinischen Abteilung des  
Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

# **Regulation der Genexpression des Diabetes-assoziierten Autoantigens IA-2 in INS-1 Betazellen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

**Thi Bang Tam Nguyen**

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jochen Seissler

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Norbert Gattermann

## Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
APC	Antigen Presenting Cell
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BB-Ratte	Biobreeding-Ratte
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
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. <sup>3,7</sup> ]decan} -4-yl)phenylphosphat
DAG	Diacylglycerol
DDFI	Deutsches Diabetes Forschungsinstitut
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothrietol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 kg x m/s <sup>2</sup> )
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase

Gi	inhibitorisches GTP-Bindungsprotein
GIP	Gastric inhibitory polypeptide (= Enterogastron)
GLP-1	Glucagon-like polypeptide - 1
Gs	stimulierendes GTP-Bindungsprotein
h	Stunde ("hour")
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IA-2	Inselzell-Antigen 2
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICA 69	Islet cell antigen 69
INS-1	Insulinoma-Zelllinie 1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
KF	Kontrollfragment
l	Liter
LB-Medium	Lennox L Broth-Medium
m	Meter
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro- ( $10^{-6}$ )
mol	Molar
MOPS	3'-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
N	Stickstoff
n	nano- ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid Adenin Di-Nucleotid (Phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMMA	N-Monomethyl-L-arginin-monoacetat
NO	Stickstoffmonoxid
NOD-Maus	Non-obese-diabetic Maus
NTF	Aminoterminales Fragment
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PDX1	Pancreatic duodenum homeobox protein 1
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
P/S	Penicillin/Streptomycin
R	Rezeptoragonist
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonukleinsäureinhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung ("standard deviation")
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TMF	Transmembranfragment
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten ("Units")
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktosid
z. B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Diabetes mellitus</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus.....	2
1.1.2 Autoantikörper und Autoantigene beim Typ 1 Diabetes.....	4
1.1.2.1 Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2.....	8
<b>1.2 Regulation der funktionellen Aktivität der Betazellen</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Fragestellung</b> .....	<b>13</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Zelllinie .....	14
2.1.2 Tiere .....	14
2.1.3 Material und Geräte .....	14
2.1.4 Zellkultur .....	14
2.1.5 Molekularbiologie .....	15
2.1.6 Medien.....	17
2.1.7 Puffer und Stammlösungen .....	18
2.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.9 Geräte.....	20
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Kultivierung und Stimulation der INS-1 Insulinoma-Zellen.....	21
2.2.2 Isolierung von Langerhans`schen Inseln .....	21
2.2.3 Bestimmung der Insulinkonzentration .....	22
2.2.4 cDNA Synthese.....	23
2.2.4.1 Isolierung der Gesamt RNA aus INS-1 Zellen.....	23
2.2.4.2 RNA-Extraktion aus Inseln mit Trizol.....	23
2.2.4.3 Photometrische RNA Konzentrationsbestimmung .....	24
2.2.4.4 Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese).....	25
2.2.5 Herstellung der Standard Fragmente.....	26
2.2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	26
2.2.5.2 Gelelektrophorese .....	28
2.2.5.3 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel .....	28
2.2.5.4 Ligation der DNA-Fragmente .....	29
2.2.5.5 Transformation von E.coli Bakterien .....	29
2.2.5.6 Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien.....	30
2.2.5.7 Klonierung des internen Standards.....	30
2.2.5.8 Herstellung der Kompetitorfragmente.....	32
2.2.5.9 DNA-Sequenzierung .....	33
2.2.6 Northern Blot Analyse .....	34
2.2.7 Aufbau und Optimierung der quantitativen kompetitiven RT-PCR .....	35
2.2.7.1 Aufbau der quantitativen RT-PCR.....	35
2.2.7.2 Optimierung der quantitativen RT-PCR.....	37
2.2.7.3 Berechnung der Stimulationsindices .....	38
2.2.8 Analyse der Regulation der IA-2 mRNA Expression.....	39
2.2.8.1 cAMP und PKC Signaltransduktionskaskade .....	39
2.2.8.2 Regulation der IA-2 Expression durch Glukose und Hormone .....	40
2.2.8.3 Einfluss von Sulfonylharnstoffe und Diazoxid auf die IA-2 Expression .....	41
2.2.9 Statistik .....	41

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung und Optimierung der quantitativen kompetitiven RT-PCR</b>	<b>42</b>
3.1.1	Nachweis der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen	42
3.1.2	Synthese der internen Standards	43
3.1.3	Einstellung der internen Standards	44
3.1.4	Ermittlung der Plateauphase zur Optimierung der quantitativen RT-PCR	45
<b>3.2</b>	<b>Regulation der IA-2 mRNA Expression</b>	<b>48</b>
3.2.1	Untersuchung der an der IA-2 mRNA Expression beteiligten Signaltransduktionswege	48
3.2.2	Regulation der IA-2 mRNA Expression in Ratten Inseln	53
3.2.3	Vergleich der quantitativen kompetitiven RT-PCR mit dem Northern Blot	54
3.2.4	Regulation der IA-2 mRNA Expression durch Glukose	55
3.2.5	Einfluss von endokrinen Faktoren auf den IA-2 mRNA Spiegel	58
3.2.6	Einfluss von Glibenclamid und Diazoxid auf die IA-2 mRNA Expression	61
<b>3.3</b>	<b>Vergleich der Stimulation der IA-2 mRNA Expression mit der Insulinsekretion</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>85</b>
7.1	Danksagung	85
7.2	Lebenslauf	86
7.3	Publikationen	87

## 1 Einleitung

### 1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine durch pathologisch erhöhten Blutglukosespiegel charakterisierte, multifaktoriell bedingte, chronische Regulationsstörung des Glukosestoffwechsels, bei der ein absoluter oder relativer Mangel an Insulin vorherrscht (Castano et al., 1990). Die Hyperglykämie führt zu den typischen Symptomen wie Polydipsie, Polyurie und Leistungsminderung. Bei extremen Stoffwechselentgleisungen kommt es zu einer lebensbedrohlichen diabetischen Ketoazidose mit Nüchternhyperglykämie, Glukos- und Ketonurie, sowie schwerwiegenden Störungen des Säure-Basen- und Elektrolyt-Haushaltes infolge des verminderten zellulären Glukoseangebots und daraus resultierender verstärkter Lipo- und Proteolyse. Unterschieden wird der Typ 1 Diabetes mit absolutem Insulinmangel aufgrund einer kompletten Zerstörung der Betazellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas vom Typ 2 Diabetes, bei dem eine Kombination zwischen Insulinresistenz und relativem Insulinmangel vorherrscht.

Nach den Diagnosekriterien der American Diabetes Association (ADA) und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) wird zwischen dem immunologisch bedingten Typ 1a und dem idiopathischen Typ 1b (ADA, 1997; Scherbaum et al., 2001; Atkinson et al., 2001) unterschieden. In Europa und Nordamerika sind etwa 90% der Fälle dem Typ 1a Diabetes zuzuordnen. Dieser entwickelt sich durch einen chronischen immunologisch vermittelten Destruktionsprozess, der häufig über Monate bis mehrere Jahre verläuft. Erst wenn mehr als 90% der Betazellen zerstört sind, manifestieren sich die typischen Diabetessymptome. Der absolute Insulinmangel macht eine lebenslange exogene Zufuhr von Insulin notwendig.

Der Typ 1 Diabetes ist die häufigste endokrine Erkrankung im Jugendalter. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 14. und 20. Lebensjahr, wobei der Typ 1 Diabetes aber auch im höheren Alter auftreten kann.

Die Prävalenz in der Bundesrepublik Deutschland wird auf annähernd 8% geschätzt. Die weltweite Inzidenz des Typ 1 Diabetes liegt in Japan bei 1,7/100000 Erkrankungen/Jahr und in Finnland 29,5/100000 Erkrankungen/Jahr. In den westlichen Industrieländern ist der Typ 1 Diabetes nach dem Asthma bronchiale die zweithäufigste chronische Erkrankung im Kindesalter (Leslie et al., 1999; Dorman et al., 1990).

### 1.1.1 Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus

Große Fortschritte im Verständnis der Pathogenese des Typ 1a Diabetes wurden in den letzten Jahren durch Studien an zwei Tiermodellen der non-obese diabetic (NOD) Maus und der Bio Breeding (BB) Ratte ermöglicht. In beiden Tiermodellen konnte gezeigt werden, daß in einer sehr frühen Phase der Diabetesentwicklung eine Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen) stattfindet. In der weiteren Folge wandern zunehmend autoreaktive Lymphozyten ein, die die Betazellen über einen autoantigenspezifischen Autoimmunprozess direkt zerstören.

Faktoren, die bei der Induktion des Autoimmunprozesses beteiligt sind, konnten bisher erst zum Teil identifiziert werden. Eine wichtige Rolle spielt das komplexe Zusammenspiel zwischen der genetischen Prädisposition und verschiedenen Umweltfaktoren. Die stärkste genetische Assoziation ist mit denjenigen Genen zu verzeichnen, die die Histokompatibilitätsantigene (HLA) der Klasse II DR und DQ kodieren. Etwa 90% aller Diabetiker tragen die Allele DQA1\*0301-DQB1\*0302 oder DQA1\*0501-DQB1\*0201. Demgegenüber wirken die Allele DQA1\*0102-DQB1\*0602 und DQA1\*0103-DQB1\*0602 diabetesprotektiv. Sind Geschwister HLA identisch, so liegt das Diabetesrisiko bei 15-20%, während nur 0,4-1% der HLA diskordanten Geschwister ebenfalls an einem Typ 1 Diabetes erkranken (Nepom 1995). Neben den HLA-Klasse II-Merkmalen wurden in den letzten Jahren weitere Genorte wie z.B. das CTLA-4 Gen oder eine Variabilität am Insulin-Genort (VNTR) beschrieben, die mit dem Typ 1 Diabetes assoziiert sind (Mein et al., 1998; Schranz und Lernmark, 1998). HLA Klasse II-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung und der Präsentation von Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen. Es wird deshalb vermutet, daß die diabetesassoziierten HLA-Moleküle durch die Bindung definierter Epitope von Autoantigenen entweder zu einer unzureichenden Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus führen oder bestimmte Subpopulationen von diabetogenen T-Lymphozyten besonders gut stimulieren.

Da die Konkordanz von eineiigen Zwillingen für den Typ 1 Diabetes nur bei 30-50% liegt (Leslie et al., 1997), müssen Umweltfaktoren ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Diabetesentwicklung spielen. Diskutiert werden verschiedene Virusinfektionen wie z.B. Coxsackie- und Rötelviren.

Eine frühzeitige perinatale Ernährung mit Kuhmilchprodukten und die Aufnahme von Toxinen wie z.B. Schwermetalle und Nitrosamine sind ebenfalls an der Diabetesentwicklung beteiligt (Übersicht in Akerblom 1998). Eindeutig nachgewiesen ist die Korrelation zwischen einer kongenitalen Rötelninfektion und der Diabetesentwicklung. Etwa 10-20% der intrauterin infizierten Kinder erkranken innerhalb der ersten 25 Lebensjahre an einem Typ 1 Diabetes (Clements et al., 1995). Umstritten ist die Assoziation des Diabetes mit Coxsackie B-Virus Infektionen. Mehrere Arbeiten konnten bei frisch manifestierten Typ 1 Diabetikern erhöhte Coxsackie B-IgM- und -IgG-Titer nachweisen (Banatvala et al., 1985; Clements et al., 1995), was jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnte (Dippe et al., 1975; Tuvemo et al., 1989). Neue Ergebnisse mit PCR-Analysen weisen darauf hin, dass möglicherweise eine intrauterine oder perinatale Coxsackie Virus Infektion kurz nach der Geburt mit der späteren Diabeteserkrankung korreliert (Hyöty et al., 1998; Lönnrot et al., 1998). Daneben werden auch Infektionen mit Retroviren, Cytomegalie- und Mumps-Viren als mögliche Diabetes auslösende Ereignisse vermutet (Übersicht in Akerblom 1998).

Zahlreiche Arbeiten haben eine signifikant höhere Diabetesinzidenz bei Kindern nachweisen können, die innerhalb der ersten 4 Lebensmonate mit Kuhmilch ernährt worden sind (Gerstein 1994; Norris et al., 1996; Pozzilli et al., 1998). Die Assoziation des Typ 1 Diabetes mit Kuhmilchernährung oder bestimmten Virusinfektionen wird mit dem sogenannten molekularen Mimikry erklärt. Ist eine Ähnlichkeit oder eine Teilidentität zwischen einem Antigen in der Betazelle und einem Protein in der Nahrung oder einem Virus vorhanden, so kann eine Immunreaktion, die primär gegen das Fremdprotein gerichtet ist, auf körpereigene Strukturen (Selbstantigene) übergreifen. Wird die Immunabwehr (T-Lymphozyten) durch das Fremdantigen stark stimuliert, kann es auf diese Weise zum Überwinden der Selbsttoleranz und somit zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung kommen (Maclaren et al., 1997).

Sequenzhomologien wurden sowohl zwischen dem P2-C Antigen des Coxsackie B-Virus und dem Autoantigen Glutaminsäure Decarboxylase (GAD) (Vreugdenhil et al., 1998) als auch zwischen einem kurzem Aminosäuresegment des bovinen Albumins (ABBOS) und GAD wie auch dem Betazellantigen ICA69 beschrieben (Atkinson et al., 1994; Tian et al., 1994). Ob und in welchem Maße das molekulare Mimikry die Diabetesentstehung beeinflusst, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Nach der Induktion der Autoimmunreaktion mit dem Auftreten einer „Peri“- oder „Intraislet“-Insulitis wird die Entwicklung eines manifesten Diabetes entscheidend von der Steuerung der Immunreaktion beeinflusst. Bei der NOD Maus konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass beim Typ 1 Diabetes eine Imbalance zwischen zwei verschiedenen T-Helfer (Th)-Lymphozytensubpopulationen vorliegt (Bach 1994). Th1-Zellen, die durch die Sekretion der Zytokine Interleukin-2 (IL-2), Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrosefaktor-Alpha (TNF $\alpha$ ) charakterisiert sind, wirken proinflammatorisch und zytotoxisch. Durch adaptiven Transfer der Th1-Zellen von erkrankten in gesunde NOD Mäuse konnte deren diabetogene Wirkung eindeutig belegt werden (Katz et al., 1995). Demgegenüber fördern Th2-Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren, die Antikörperproduktion und üben durch Hemmung der inflammatorischen Immunzellen einen diabetesprotektiven Effekt aus.

Da Th1- und Th2-Zellen sich gegenseitig hemmen, kann die Diabetesentwicklung durch die Modifizierung der Immunreaktion in Richtung der Ausbildung einer Th2-Immunität verhindert werden (Rabinovitch 1998). Molekulare Mechanismen, die zur Polarisierung einer Th1 dominanten Autoimmunreaktion führen, sind allerdings sowohl bei der NOD Maus wie auch beim Menschen bisher unbekannt.

### 1.1.2 Autoantikörper und Autoantigene beim Typ 1 Diabetes

Als erstes definiertes Zielantigen beim Typ 1 Diabetes wurde im Jahr 1983 das Insulin beschrieben (Palmer et al., 1983). Für das Auftreten von Insulinautoantikörpern (IAA) besteht eine inverse Korrelation zum Alter. So lassen sich insbesondere bei Kindern, die im Alter unter 5 Jahren einen Typ 1 Diabetes entwickelt haben, Insulinautoantikörper in hoher Prävalenz (50-90%) nachweisen (Vardi et al., 1988). Als eine der frühesten nachweisbaren Autoantikörper in der Entwicklung des Typ 1 Diabetes besitzen sie einen besonderen prädiktiven Wert (Yu et al., 2000).

Ausgangspunkt für die Klonierung weiterer Autoantigene war der Nachweis und die Charakterisierung von zytoplasmatischen Autoantikörpern. Bereits im Jahre 1974 wurden von der Arbeitsgruppe Bottazzo die zytoplasmatischen Inselzellantikörper (ICA) beschrieben (Bottazzo et al., 1974).

Die ICA, nachgewiesen mit einem indirekten Immunfluoreszenztest auf humanen Pankreaskryostatschnitten, sind bei 80-90% der frisch manifestierten Typ 1 Diabetiker positiv und gegen verschiedene Autoantigene der Langerhans'schen Inseln gerichtet (Richter et al., 1993, Seissler et al., 1993). Als ein wichtiges Zielantigen der ICA wurde 1990 das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) charakterisiert. Es existieren Isoformen der Glutaminsäure-Decarboxylase mit unterschiedlichen Molekulargewichten, nämlich GAD65 (65 kDa) und GAD67 (67 kDa) (Baekkeskov et al., 1990). Diese besitzen in ihrer Aminosäuresequenz eine 65%ige Homologie (Bu et al., 1992) und enthalten beide eine Pyridoxalphosphatbindungsstelle (PLP), welche für die enzymatische Aktivität als Kofaktor dient (Leslie et al., 1999). GAD findet sich im zentralen wie peripheren Nervensystem, im Hoden und im Ovar sowie im Pankreas. In den Langerhans'schen Inseln ist die Isoform GAD65 in der Membran der synaptic-like Mikrovesikel, während die Isoform GAD67 im Zytoplasma lokalisiert ist (Bu et al., 1992). Als Enzym katalysiert GAD die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters  $\gamma$ -Amino-buttersäure (GABA) aus Glutaminsäure. Bisher ist die Funktion von GAD außerhalb von Neuronen nicht geklärt. Der Nachweis von GAD, GABA als auch GABA-Rezeptoren in Betazellen führt zu der Hypothese, dass GABA in der parakrinen Signaltransduktion der Inseln involviert ist (Leslie et al., 1999). Antikörper gegen GAD65 wurden bei ca. 60-70%, gegen GAD67 jedoch nur bei etwa 10-20% der Typ 1 Diabetespatienten bei klinischer Manifestation nachgewiesen (Seissler et al., 1993; Hagopian et al., 1993; Verge et al., 1994; Seissler et al., 1998).

Autoantikörper gegen GAD sind bei etwa 50-70% der Typ 1 Diabetikern nachweisbar (Atkinson et al., 1992; Lohmann et al., 1994; Wicker et al., 1996). Diese sind teilweise gegen das PEVKEK-Peptid gerichtet, welches eine hohe Homologie zu dem Coxsackie B P2-C Antigen aufweist (Atkinson et al., 1994).

Als zweites wichtiges Zielantigen der ICA wurde ein Protein aus der Familie der Tyrosinphosphatasen identifiziert, welches als IA-2 oder als ICA 512 bezeichnet wird (Rabin et al., 1992; Lan et al., 1994; Payton et al., 1995). IA-2 Autoantikörper sind bei etwa 50-70% der Typ 1 Diabetiker nachweisbar (Wiest-Ladenburger et al., 1997; Dittler et al., 1998; Seissler et al., 1996). In Analogie zum GAD wurden bei Typ 1 Diabetiker auch autoreaktive T-Lymphozyten detektiert, die IA-2 erkennen (Ellis et al., 1998; Lohmann et al., 1999).

Sowohl Autoantikörper als auch T-Zellreaktivität, die gegen den intrazytoplasmatischen Teil von IA-2 gerichtet sind, konnten nachgewiesen werden (Zhang et al., 1997). Ein Teil der IA-2 Antikörper (30-50%) zeigt Kreuzreaktivität gegen ein stark homologes Protein aus der Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen, das IA-2 $\beta$  oder Phogrin genannt wird (Lu et al., 1996; Hatfield et al., 1997).

Nach Klonierung von GAD und IA-2 wurden neue Radioimmunoassays (RIA) entwickelt, mit denen ein quantitativer Antikörpernachweis möglich wurde. Die Kombination der Autoantikörper gegen GAD, IA-2 und IAA ermöglicht die Erfassung von mehr als 90% ICA positiver Typ 1 Diabetiker. Bei einem Teil der Typ 1 Diabetiker sind neben Autoantikörpern gegen GAD und IA-2 zusätzliche Diabetes-assoziierte Autoantikörper nachweisbar. Diese sind unter anderem gegen ein bisher nicht kloniertes glykosyliertes Antigen (GLIMA 38) (Aanstoot et al., 1996), gegen Glykolipide (Dotta et al., 1995; Dotta et al., 1997) und gegen das ICA69 Antigen gerichtet. Da ihre Prävalenz nur gering ist und der Nachweis dieser Antikörper schlecht standardisiert ist, haben sich nur die GAD Antikörper in Kombination mit den IA-2 Antikörpern und den IAA in der modernen Routinediagnostik durchgesetzt (Wiest-Ladenburger et al., 1997; Morgenthaler et al., 1997; Dittler et al., 1998).

Die Einfachheit der Detektionsmethode mittels RIA hat groß angelegte Screening-untersuchungen zur Früherkennung des Typ 1 Diabetes ermöglicht. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Anti-GAD-, Anti-IA-2- und Insulin-Autoantikörpern (IAA) mit einem erhöhten Diabetesrisiko korreliert. Hierbei ist das Risiko abhängig von der Anzahl der positiven Antikörper. Ist bei Geschwistern von Typ 1 Diabetikern nur ein Antikörper positiv, so liegt das 10-Jahres-Diabetesrisiko bei 0-15%. Bei Nachweis von zwei Antikörpern erhöht sich das Risiko auf 21-44%, und bei drei positiven Antikörpern liegt das Risiko, innerhalb von 10 Jahren an einem Diabetes zu erkranken, bei 64-100% (Verge et al., 1996; Kulmala et al., 1998).

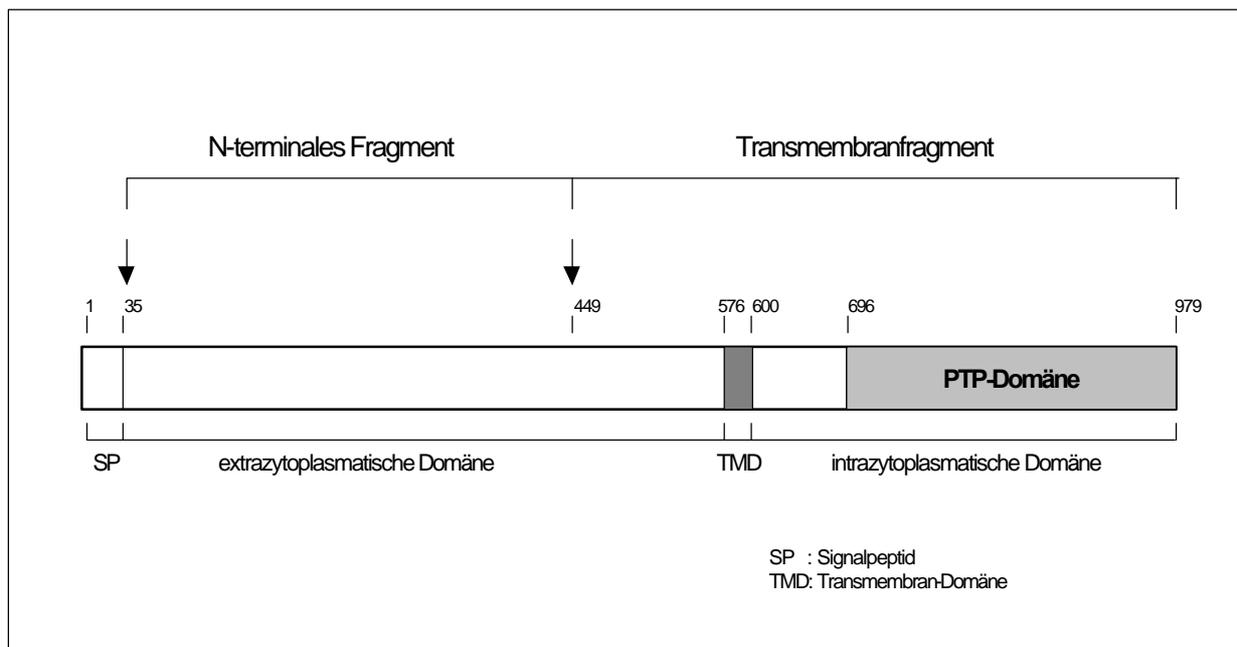
In Familien, in denen kein Diabetes bekannt ist, konnte diese Assoziation bestätigt werden. Hier liegt das Diabetesrisiko aufgrund von Unterschieden in der genetischen Prädisposition deutlich niedriger (ein Antikörper: 0-5%; zwei Antikörper: 9-50%; drei Antikörper: 57-59%) (Bingley et al., 1997; Knip et al., 1998).

Die spezifischen Autoantikörper bei Typ 1 Diabetes sind Jahre vor der Manifestation der Erkrankung im Patientenserum nachweisbar und haben aufgrund dessen als Marker für die Früherkennung des Diabetes eine große Bedeutung.

### 1.1.2.1 Protein-Tyrosin-Phosphatase IA-2

IA-2 ist ein Transmembranprotein, welches sich in neurosekretorischen Zellen des Gehirns, der Hypophyse sowie in den insulinproduzierenden Betazellen findet (Lan 1994, Solimena 1996). Humanes IA-2 wird zunächst als 979 Aminosäuren langes Protein synthetisiert und ist nach Abspaltung der Signalsequenz in den sekretorischen Granula gespeichert (Hermel et al., 1999). Die aminoterminalen Region liegt extrazytoplasmatisch innerhalb der Granula und beinhaltet ein rezeptorähnliches cysteinreiches Motiv und zwei Glykosylierungsstellen. Im intrazytoplasmatischen C-Terminus liegt eine als PTP-Domäne bezeichnete Region (AS 696-979), die etwa 30% Homologie zu Proteinen aus der Familie der membranassoziierten Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) aufweist. Durch die in den Insulingranula vorhandenen Prohormon-Konvertasen erfolgt eine Abspaltung des Transmembranproteins in ein N-terminales Fragment (IA-2-NTF) und ein Transmembranfragment IA-2-TMF. Western Blot-Untersuchungen lassen vermuten, dass der intrazytoplasmatische Teil von IA-2 durch Phosphorylierung modifiziert werden kann (Roberts et al., 2001).

Abbildung 1.1: Proteinstruktur des humanen Autoantigens IA-2



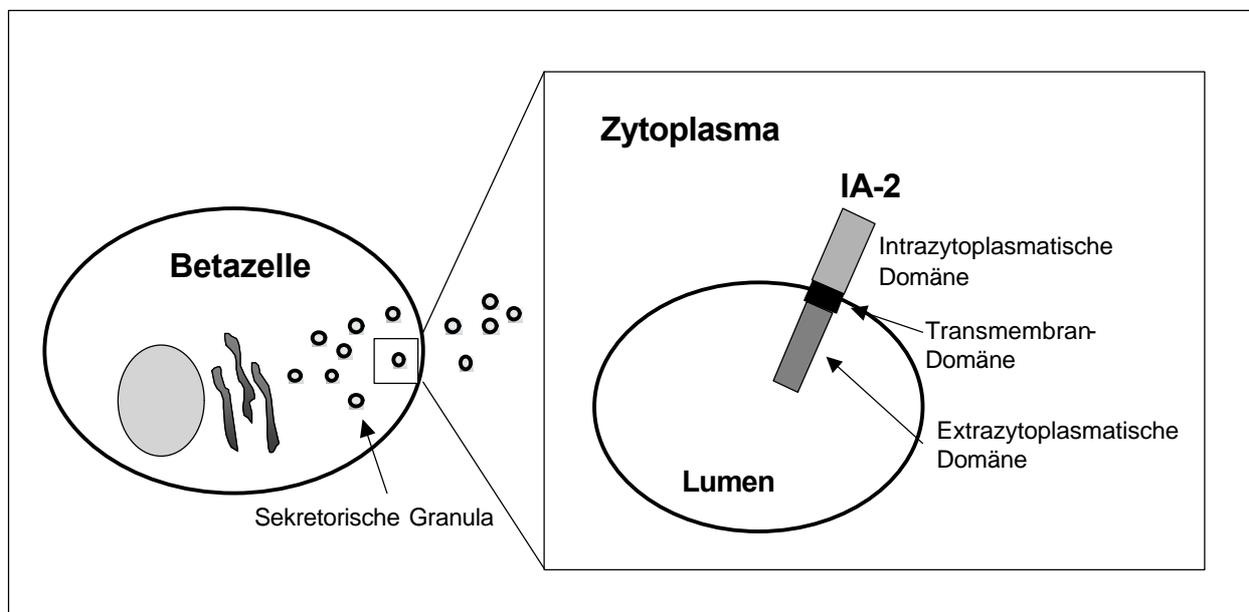
**IA-2 ist ein Transmembranprotein mit 979 Aminosäuren, welches sich in 3 Hauptabschnitten gliedert: extrazytoplasmatische Domäne (541 AS), Transmembranregion (24 AS) und intrazytoplasmatische Domäne (283 AS).**

Da IA-2 und IA-2 $\beta$  eine etwa 72%ige Homologie in der zytoplasmatischen Region aufweisen, werden die beiden in eine gemeinsame Proteinfamilie innerhalb der PTP-Superfamilie eingeordnet (Wasmeier und Hutton, 1996; Lu et al., 1996, Cai et al., 2001). Das aktive Zentrum der PTP-Domäne von IA-2 und IA-2 $\beta$  unterscheidet sich in zwei Aminosäuren von allen bekannten enzymatisch aktiven Tyrosinphosphatasen. Dies erklärt möglicherweise, dass für beide Proteine bisher keine Phosphataseaktivität wie bei den anderen PTP-Mitgliedern nachgewiesen werden konnte (Notkins et al., 1998).

IA-2 ist kein betazellspezifisches Protein. Es wird unter anderem in neuroendokrinen Geweben wie z. B. in Neuronen des Zentralnervensystem, in der Hypophyse, in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes und in den Betazellen der Langerhans`schen Inseln exprimiert (Lan et al., 1994). In den Betazellen ist IA-2 in den sekretorischen Granula lokalisiert.

Die Funktion von IA-2 ist bis heute ungeklärt. Da IA-2 in den Insulinvesikeln der Betazellen lokalisiert ist, wird vermutet, dass das Molekül eine wichtige Rolle bei der Reifung und Ausschleusung der Sekretionsgranula einnimmt (Dirkx 1998).

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Lokalisation von IA-2 in der Betazelle



IA-2 ist in der Membran der sekretorischen Granula der Betazelle lokalisiert. Auf der linken Hälfte der Abbildung wird eine Betazelle mit einigen Funktionseinheiten (Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Insulingranula) dargestellt. Rechts ist die Ausschnittsvergrößerung eines sekretorischen Vesikels mit IA-2 als Transmembranprotein. Die extrazytoplasmatische Domäne von IA-2 ragt in das Granulalumen hinein.

## 1.2 Regulation der funktionellen Aktivität der Betazellen

Der Inselapparat bildet den endokrinen Teil des Pankreas, welcher sich mit 1-2% als ein kleiner Anteil des vorwiegend exokrinen Bauchspeicheldrüsegewebes darstellt. Die ca. 2 Millionen endokrinen Zellen sezernieren die beiden Schlüsselhormone für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels: Insulin und Glukagon.

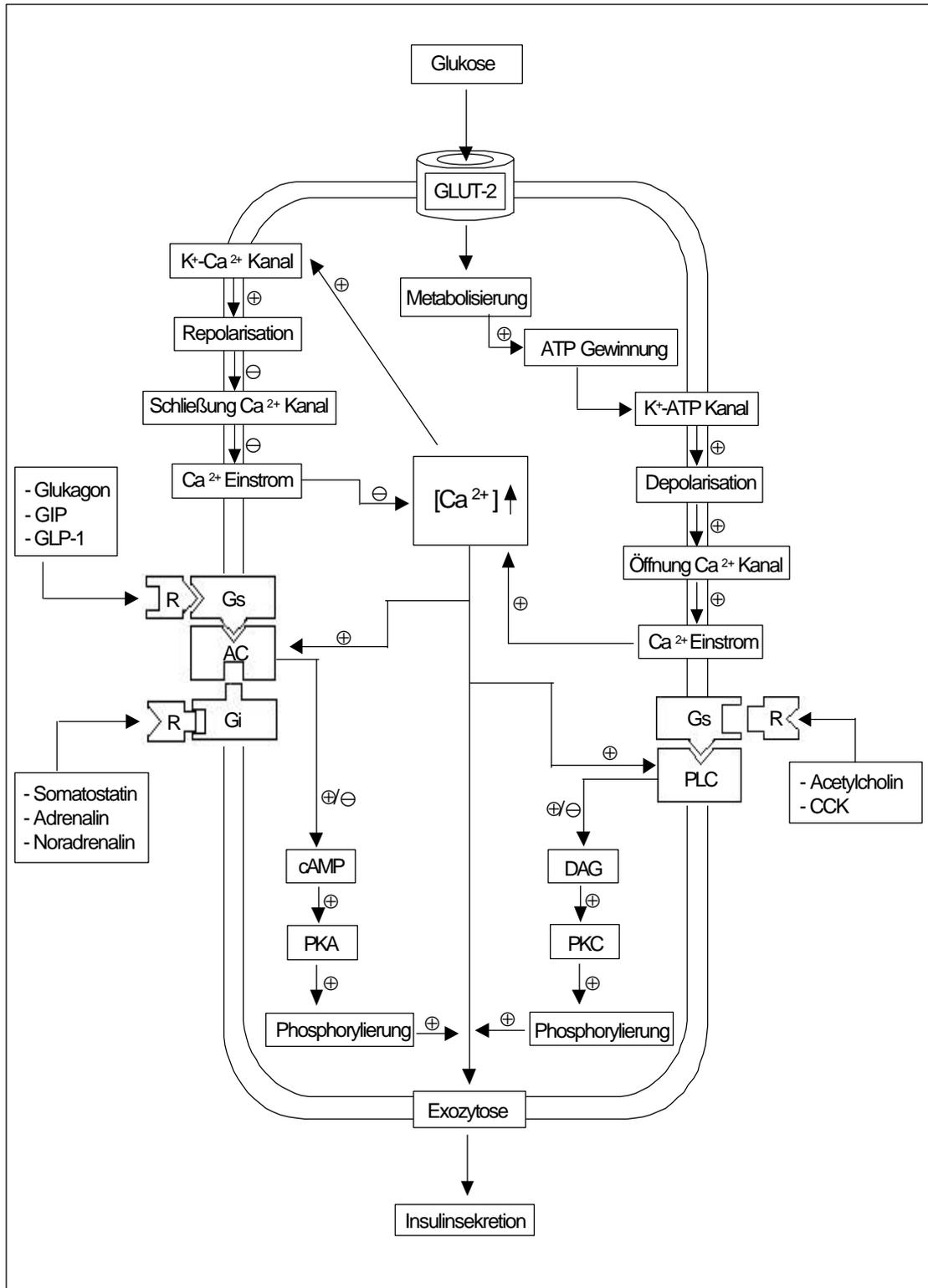
Der adäquate Reiz der Insulinfreisetzung ist ein Anstieg des Blutglukosespiegels. Daneben existieren eine große Bandbreite von Hormonen, Neurotransmittern und regulatorischen Peptiden, die die Insulinausschüttung beeinflussen. Hormone wie Glukagon, gastrisch-inhibitorisches Polypeptid (GIP), Cholezystokinin, Vasoaktiv-Intestinales Polypeptid (VIP) und das Glukagon-like Polypeptid-1 (GLP-1) führen zur Stimulation der Insulinsekretion. Hemmend auf die Insulinsekretion wirken dagegen Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin), Somatostatin, Pankreastatin, Galanin und Neuropeptid Y (Holst, 1992; Stryer, 1990; Thomas, 1998).

Die Insulinfreisetzung wird darüber hinaus durch das vegetative Nervensystem moduliert: parasympathische Impulse sowie eine Erregung sympathischer  $\beta_2$ -Rezeptoren steigern, Erregung der  $\alpha_2$ -Rezeptoren hemmen die Insulinsekretion (Mutschler et al., 2000; Nonogaki 2000; Ahren 2000).

Insulin wird fast ausschließlich in den Betazellen des endokrinen Pankreas und im geringem Maße im Thymus exprimiert. Die genomische DNA der meisten Wirbeltiere enthält ein Insulingen. Beim Menschen ist das Insulingen auf den Chromosom 11 lokalisiert (Owerbach et al., 1980; Steiner et al., 1985). Die Betazelle ist speziell adaptiert für die Synthese von Präproinsulin (Insulinvorstufe), Speicherung hoher Insulinkonzentrationen in Membranvesikeln, Insulinbiosynthese und -sekretion auf spezifische Stimulationsreize. Durch proteolytische Abspaltung der Signalsequenz im endoplasmatischen Retikulum entsteht aus dem Präproinsulin das Proinsulin. In Vesikel verpackt erfolgt dann der Transport des inaktiven Proinsulins zum Golgi-Apparat. Hier entsteht durch Ausschneiden des C-Peptids aus dem Proinsulin das wirksame Insulin. Insulin hat eine relative Molekularmasse von ca. 6000 Dalton und besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 AS und der B-Kette mit 30 AS. In den sekretorischen Granula liegt das Insulin durch Präzipitation mit Zinkionen in Form von Mikrokristallen gespeichert vor und wird bei Bedarf durch Exozytose ausgeschüttet.

Nach Transport der sekretorischen Granulas zur Betazelloberfläche verschmelzen sie mit der Zellmembran und es erfolgt die Ausschüttung des Insulins (Löffler und Petrides, 1998). Die Transkription des Insulingens, die Translation der Insulin mRNA und die Sekretion von Insulin werden durch eine Vielzahl von Metaboliten und Hormone beeinflusst, wobei Glukose den größten metabolischen Reiz für die Insulinbiosynthese und -sekretion darstellt (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Matschinsky et al., 1998; Prentki et al., 1997; Henquin et al., 1994; Newgard et al., 1995). Pankreatische Betazellen exprimieren den Glukosetransporter GLUT 2, welcher eine schnelle Glukoseaufnahme in die Zelle ermöglicht (Thorens et al., 1982). Die geringe Konzentration der Hexokinase (HK) in der Betazelle führt zu niedrigem Glukoseabbau und ATP/ADP Spiegel und ermöglicht somit bei niedrigen Glukosekonzentrationen von  $< 2,5$  mmol/l eine konstante basale Insulinsekretionsrate (Schuit et al., 1997; Detimary et al., 1998). Bei höheren Glukosekonzentrationen von  $> 2,5$  mmol/l wird die Glukokinase (= Hexokinase IV) aktiviert, die ihrerseits die Phosphorylierung von Glukose zur Glukose-6-P katalysiert. Es folgen verschiedene Schritte der Glykolyse. Sie ist eine Folge von Reaktionen, in denen Glukose zu Pyruvat umgewandelt wird. In aeroben Organismen geht sie dem Citratzyklus und der Atmungskette voraus, die zusammen fast die gesamte Energiegewinnung aus Glukose ausmachen. Unter aeroben Bedingungen tritt das Pyruvat in die Mitochondrien über und wird hier vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert (Stryer, 1991). Die bei der Glykolyse entstehenden NADH sind energiereiche Moleküle, da sie jeweils ein Elektronenpaar mit hohem Übertragungspotential besitzen. Bei dem Prozeß, der als oxidative Phosphorylierung bezeichnet wird, werden Elektronen auf molekularem Sauerstoff übertragen, wobei Energie zur ATP-Erzeugung frei werden. Ein ATP-Anstieg schließt ATP-gesteuerte Kaliumkanäle, was wiederum zur Abnahme der Kaliumpermeabilität und dadurch zur Abnahme des Membranruhepotentials von etwa  $-65$  auf  $-30$  mV führt. Hierdurch strömen durch spannungsabhängige Kalziumkanäle Kalziumionen aus dem Extra- in den Intrazellularraum ein. Die Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytosol aktiviert dann verschiedene intrazelluläre Transduktionssignale wie PKA, PKC, cAMP und stimuliert so den Exozytoseprozess und die Insulinsynthese (Abb. 1.3)(Cook et al., 1984; Ashcroft et al., 1984; Ahren 2000).

Abbildung 1.3 Regulation der Insulinsekretion in der Betazelle



Mögliche interaktive Wirkungsmechanismen von Hormonen, Inselpeptiden und Neurotransmittern auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion. AC: Adenylatzyklase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CCK: Cholezystokinin; DAG: Diacylglycerol; Gi und Gs: inhibitorisches und stimulierendes GTP-Bindungsprotein; GIP: Gastrisch-inhibitorisches Polypeptid; GLP-1: Glukagon-like Polypeptid-1; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; R: Rezeptoragonist.

### 1.3 Fragestellung

Bei Manifestation des Typ 1 Diabetes sind 80-90% der Betazellen durch einen Autoimmunprozess zugrunde gegangen. Die in den neuroendokrinen Zellen nachweisbare Tyrosinphosphatase IA-2 ist ein wichtiges Autoantigen beim Typ 1 Diabetes. In den Langerhans'schen Inseln der Betazellen ist das IA-2 in den Membranen der sekretorischen Granula lokalisiert. Da bis heute die biologische Funktion dieses wichtigen Autoantigens weitgehend unbekannt ist, sollte in der vorliegenden Untersuchung die Regulation der IA-2 Genexpression in Betazellen analysiert werden. Hierfür standen die partiell glukosesensitiven INS-1 Insulinomazellen und primär isolierte Ratten Inseln zur Verfügung. Für die Bestimmung der IA-2 mRNA Expression sollte eine quantitative kompetitive RT-PCR Methode etabliert werden. Mit dieser neuen Methode erfolgte die Austestung stimulierender und inhibierender Signaltransduktionswege in den Betazellen. Anschließend wurde der Effekt verschiedener metabolischer und hormoneller Faktoren auf die IA-2 mRNA Expression untersucht.

Ziel der Studie war es, grundlegende Mechanismen und Faktoren zu identifizieren, die an der Regulation der IA-2 Expression in Betazellen beteiligt sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinie

Die Versuche wurden mit einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) durchgeführt. Es handelt sich bei den INS-1 Zellen um partiell Glukose-sensitive Zellen, die von Prof. C.B. Wollheim (Universität von Geneva, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurden.

#### 2.1.2 Tiere

Zur Isolierung von Langerhans'schen Inseln wurden weibliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g verwendet. Die Tiere wurden von dem Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf gezüchtet. Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden nur Ratten verwendet, die eine Nacht vor der Inselisolierung nüchtern waren. Vor der Organentnahme wurden die Tiere mit einer Überdosis Nembutal® eingeschläfert.

#### 2.1.3 Material und Geräte

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeiten fanden unter einer Laminar Air Flow Sicherheitsbank der Klasse II statt.

Hitzebeständige Lösungen und Glaswaren wurden bei 120°C und 2 bar für 30 min autoklaviert. Alle Pipettenspitzen, die zur RNA Isolierung verwendet wurden, wurden zur Eliminierung von RNasen mit 0,1% DEPC-Wasser vorbehandelt und zur vollständigen Entfernung des DEPC's zweimal autoklaviert.

Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Filter mit der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

#### 2.1.4 Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Diazoxid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Einfriermedium	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Pharmacia, Uppsula, Schweden

Forskolin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fötales Kälberserum	Seromed, Berlin, Deutschland
Glibenclamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glukagon (1-29)	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Glukose	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS),	Sigma, St. Louis, U.S.A
Isobutylmethylxanthine (IBMX)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kollagenase Typ V	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies, Paislay, L. T. Schottland
Mycoplasma Detektionskit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Phosphat-Puffer (PBS)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Phenolchloroform	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rat Insulin RIA Kit	DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland
Somatostatin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsinlösung	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.5 Molekularbiologie

Agarose MP	Roche, Mannheim, Deutschland
Ampicillin	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-Digoxigenin-Antikörper	Roche, Mannheim, Deutschland
BigDye Terminator Cycle Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Chromatographiewasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
CSPD	Roche, Mannheim, Deutschland
Cycler GeneAmp PCR System 9700,	Perkin Elmer, Norwalk (CT), U.S.A.
DEPC-Wasser (0,1%)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DIG RNA labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim, Deutschland

DIG Easy Hyb Solution	Roche, Mannheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim, Deutschland
Disodium	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker 1 kbp	Promega, Mannheim, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker 100 bp	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
E. coli (Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$ )	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Erase-a-Base System	Promega, Mannheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Formanid (deionisiert)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Gel-Loading Solution	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
High-Fidelity (Expand) <sup>TM</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Klenow-Enzym	Promega, Mannheim, Deutschland
LB Broth Base	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Nucleo Trap Gel Extraktion Kit	Clontech, Heidelberg, Deutschland
PCR Nucleotid Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
PCR-Tubes	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Primer for cDNA Synthesis p(dt) <sub>15</sub>	Roche, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease Ava I	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease Bst x I	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease EcoR I	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease Hinc II	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease Hind III	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionendonuklease Not I	Promega, Mannheim, Deutschland
RNA`sIN	Promega, Mannheim, Deutschland
SOC-Medium	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Superscript RNase RT	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland
T4 Polynukleotidkinase	Promega, Mannheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20: Polyoxyethylensorbitanmonolaurat,	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vektor pGEM-4Z	Promega, Mannheim, Deutschland
Vektor pGEM-TEasy	Promega, Mannheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (37%)	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.6 Medien

LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 85,5 mM Natriumchlorid 1 mM Natronlauge
RPMI-Medium I (Basal-Medium)	RPMI 1640 Medium (ohne Glukose und ohne L-Glutamin) 0,3 g/l L-Glutamin 1,25 g/l D-Glukose 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 0,1% Hefeextrakt 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM D-Glukose

## 2.1.7 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 Guanidiumchlorid 0,5 M Kaliumacetat (pH 4.2)
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 Ficoll-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-Glukose 900 ml Aqua dest.
Hanks-Stammlösung	10 x Stammlösung (1l): 1,4 g Calciumchlorid 4 g Kaliumchlorid 0,6 g Kaliumhydrogenphosphat 1 g Magnesiumchlorid (x 6H <sub>2</sub> O) 1 g Magnesiumsulfat (x 7H <sub>2</sub> O) 80 g Natriumchlorid 0,9 g Dinatriumhydrogenphosphat (x 7H <sub>2</sub> O) 10 g D-Glukose
Lysepuffer (High Pure Plasmid Isolation Kit)	0,2 M Natriumhydroxid 1% SDS
MOPS-Puffer	10 x Stammlösung: 0,2 M MOPS (pH 7,0) 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA (pH 8,0)

Neutralrotlösung	80 mg Neutralrot 1l Natriumchlorid (0,9%)
Northern Blot-Blockierungspuffer	10 x 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 Kaliumhydrogenphosphat
RNA-Probenpuffer	250 µl Formamid (deionisiert) 83 µl Formaldehyd 50 µl 10 x MOPS-Puffer 17 µl DEPC-Wasser 0,5 µl Ethidiumbromid
SSC-Puffer	20 x Stammlösung: 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	10 x Stammlösung: 0,3 M Tris-HCl (pH 7,8) 0,1 M DTT 0,1 M Magnesiumchlorid 10 mM ATP
TAE-Puffer	50 x Stammlösung: 242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) (auf 1l Wasser) Gebrauchslösung: 40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL (pH 7,6) 1 mM EDTA (pH 8,0)
Waschpuffer I (High Pure Plasmid Isolation Kit)	20mM Tris-HCL (pH 6,6) 5 M Guanidiumchlorid 37,5% Ethanol

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einfrigerbox	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Einwegpipetten (1-25 ml)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorf-Caps (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Flachbodenplatten (96-Loch)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Nylonmembran (Hybond-N+)	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen (1-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen (50 + 250 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (6- + 24-Loch)	Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 + 50 ml)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.9 Geräte

ABI 310 Sequenziersystem	Perkin Elmer, Norwalk (CT), U.S.A.
Autoklav Typ 23	Melag, Berlin, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Harnau, Deutschland
Cycler GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, Norwalk (CT), U.S.A.
Elektrophoresekammer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
ELISA-Platten-Reader	SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	MWG- Biotech, Ebersberg, Deutschland
Lichtmikroskop Flouvert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Lumi-Imager™ Workstation	Roche, Mannheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand (Merck), Darmstadt, Deutschland
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spectrophotometer BioSpec-1601	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 3 K 30	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Stimulation der INS-1 Insulinoma-Zellen

Da primäre Ratteninselzellen nur in begrenzter Menge zur Verfügung standen, wurden die ersten Untersuchungen an INS-1 Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Ratten-Insulinoma-Zelllinie, deren Funktion und Morphologie, insbesondere in Bezug auf die Insulinsekretion, sehr stark den der nativen Betazellen ähnelt (Asfari et al., 1992).

Die adhärenenten INS-1 Zellen wurden in einer 250 ml Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI 1640-Medium mit 7 mM Glukose und den Zusätzen von 2 mmol/l Glutamin, 10% Fetal Calf Serum, 1% Penicillin/Streptomycin und 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (basales Kompletmedium) bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank kultiviert. Alle 7 bis 10 Tage wurden die INS-1 Zellen trypsiniert, ausgezählt und in Kulturflaschen zu je 1 x 10<sup>5</sup> Zellen verteilt. Danach wurden die Zellen für 3 Tage in 5 ml RPMI 1640-Medium mit einer höheren Glukosekonzentration (11 mM) kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen wieder für 3 Tage in dem basalen Kompletmedium inkubiert.

### 2.2.2 Isolierung von Langerhans'schen Inseln

Für die Isolierung von Ratteninseln wurde das Abdomen eröffnet, die Aorta frei präpariert und oberhalb der iliacalen Bifurkation abgeklemmt. Die Aorta wurde punktiert und 20 ml einer Neutralrotlösung retrograd eingespritzt. Dadurch färbte sich das Pankreas und die Inseln violett an und konnte selektiv herauspräpariert werden. Das präparierte Pankreasgewebe wurde bis zur Bearbeitung in einer gekühlten Hanks-Lösung kurz aufbewahrt. In einer mit Hanks-Lösung bedeckten Petrischale wurden die Pankreata von Fett- und Bindegewebe befreit und mit einer kleinen Schere fein zerkleinert.

Das Gewebe wurde dann in einem 50 ml Falcon überführt, mit 15 ml Hanks-Lösung vermischt und bei 1200 x g für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml Hanks-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 5 mg Kollagenase Typ V zu dem Gewebe-Hanks-Lösung-Gemisch wurde das Falcon dicht verschlossen und zur Homogenisierung kräftig geschüttelt. Unter ständigen Schwenkbewegungen sollte der Kollagenverdau im vorgeheizten 37°C Wasserbad für etwa 10 bis 15 min beobachtet werden.

Durch Zugabe von 25 ml gekühlter Hanks-Lösung wurde die enzymatische Aktivität der Kollagenase gestoppt und die Probe noch 3 x mit 40 ml Hanks-Lösung mit 1% Penicillin/Streptomycin gewaschen.

Nach den Waschvorgängen wurde der Überstand gründlich abgesaugt. Zu dem Gewebe wurde dann 18 ml Ficoll-Stock (Dichte von 1,088 g/l) gegeben und zur Homogenisierung gründlich gevortext. Danach erfolgte eine vorsichtige Überschichtung des Gemisches mit 3 weiteren Ficollgradienten (Ficoll I (Dichte von 1,000 g/l), Ficoll II (Dichte von 1,056 g/l) und Ficoll III (Dichte von 1,069 g/l)) zu jeweils 4 ml. Es folgte ein ungebremster Zentrifugationsschritt für 20 min bei 1200 x g, wobei die Inseln sich zwischen der Ficoll II und III Schichtung sammeln können. Mit einer Pipette wurden die Inseln zwischen der Ficollschichtung selektiv entnommen, in einem neuen Falcon überführt und 3 x mit 40 ml Hanks-Lösung gewaschen. Unter dem Mikroskop konnten die Inseln in einer mit Hanks-Lösung bedeckten Petrischale mit einer Pipette gepickt und gezählt werden. In einem Well einer 12-Well-Platte wurden 80 Inseln ausgesät, mit dem basalen Kompletmedium und denselben Kulturbedingungen wie die INS-1 Zellen für 24 h kultiviert und dann stimuliert.

### **2.2.3 Bestimmung der Insulinkonzentration**

Die Insulinkonzentration im Zellkulturüberstand der INS-1 Zellen wurde mittels eines von Linco Research angebotenen Ratten Insulin Radioimmunoassay bestimmt. Dabei wurden radioaktiv markiertes Insulin ( $[^{125}\text{J}]$ -Insulin) und Insulinantikörper zu jeder Probe gegeben. Das von den INS-1 Zellen produzierte Insulin im Zellüberstand konkurriert mit dem radioaktiv markierten  $[^{125}\text{J}]$ -Insulin um die Antikörperbindungsstellen, so daß nach Ausfällen des Antigen-Antikörperkomplexes im Pellet das präzipitierte Insulin im Gammacounter (LB2111; Bertold) als Doppelbestimmung gemessen werden konnte. Die Insulinkonzentration im Überstand ist demnach umgekehrt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

Mittels der mitgeführten Insulinstandardkurve mit insgesamt 7 bekannten Insulinkonzentrationen konnte die Insulinkonzentration der jeweiligen Proben abgelesen werden.

Jede der Probenröhrchen enthält 100  $\mu\text{l}$  Zellüberstand (1:100 Verdünnung mit Assay Puffer) bzw. für die Erstellung der Standardkurve 100  $\mu\text{l}$  Insulinstandardlösung (0,1 bis 10 ng/ml), 100  $\mu\text{l}$  Ratten Insulinantikörper und 100  $\mu\text{l}$   $[^{125}\text{J}]$ -Insulin.

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden zu jeder Probe 1 ml des gekühlten Präzipitationsreagenz zugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzien für 20 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde entsorgt, das Pellet getrocknet und die Radioaktivität im Pellet gemessen.

## **2.2.4 cDNA Synthese**

### **2.2.4.1 Isolierung der Gesamt RNA aus INS-1 Zellen**

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Die Überstände des Kulturmediums wurden abgenommen, die kultivierten Zellen wurden zunächst in PBS resuspendiert und dann mit 400 µl guanidiniumchloridhaltigen Lyse- und Bindepuffer lysiert.

Durch gründliches Mischen wurde das Gemisch homogenisiert und danach auf ein Auffanggefäß mit einer Glasvliesmatrix überführt. Die Probe wurde bei 10000 x g für 15 sec zentrifugiert. Die an der Matrix gebundene RNA wurde zur Befreiung von kontaminierender genomischer DNA mit 90 µl DNase I für 15 min behandelt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der DNase Behandlung wurde die RNA zur Beseitigung von Begleitsubstanzen wie z.B. Salzen, Proteinen, und anderen zellulären Verunreinigungen mit ethanolhaltigem Waschpuffern gereinigt. Der 1. Waschschrift wurde mit 500 µl Waschpuffer I durchgeführt. Nach 15 sec Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Durchlauf verworfen und die Probe noch 2 x mit Waschpuffer II (1. Waschschrift mit 500 µl und 2. Waschschrift mit 200 µl Waschpuffer) gewaschen. Zuletzt wurde die gereinigte RNA mit 50 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert. Die RNA Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt.

### **2.2.4.2 RNA-Extraktion aus Inseln mit Trizol**

Die Inseln wurden mit dem Medium von der Zellkulturplatte in ein 1,5 ml Eppendorftube übertragen und bei 4000 x g für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Trizol wieder aufgenommen und gründlich vermischt. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Es homogenisiert Gewebe, ohne die RNA-Integrität zu zerstören. Nach einer Inkubationszeit von 10 - 20 min bei Raumtemperatur wurden zu den Proben 200 µl Chloroform gegeben und kräftig geschüttelt.

Daran schloss sich eine Inkubation von 2 - 3 min bei Raumtemperatur an, gefolgt von einer Zentrifugation bei 11800 x g und 4°C für 15 min. Dabei erfolgte eine Trennung der Lösung in eine untere organische gefärbte Phase, eine mittlere milchige Phase und eine obere farblos wäßrige Phase. Vorsichtig wurde die RNA enthaltende farblos wäßrige Phase entnommen und in ein sauberes 1,5 ml Eppendorftube überführt, während die organische mit gelöster genomischer DNA und die Interphase mit angereichteten Protein in dem Eppendorftube verblieben. Um die Effizienz der RNA Isolierung zu erhöhen wurde der Chloroform Extraktionsschritt wiederholt.

Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und 5 µg Glykogen wurde die RNA bei -20°C und einer Inkubationszeit von 20 min gefällt, dann mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach vollständigem Entfernen des Alkohols unter Raumtemperatur in einer Zellkulturbauch für 7 - 9 min getrocknet und am Schluss in 11 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen. Zum besseren Lösen der RNA sollte nach Zugabe des Wassers das Gemisch gevortext und für 10 min bei 55 - 60°C inkubiert werden.

#### **2.2.4.3 Photometrische RNA Konzentrationsbestimmung**

Die RNA Konzentration in µg/µl in jeder Probe wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Nach Kalibrierung des Photometers mit 10 mM Tris wurde die RNA 1:12,5 in 10 mM Tris verdünnt und die optische Dichte bei 260 und 280 nm gemessen. Die Messung der OD bei 260 nm erlaubt mittels des Lambert-Beer-Gesetzes die Berechnung der RNA Konzentration. Zusätzlich wurde die Proteinkontamination mit Hilfe der Ratio OD 260 nm/OD 280 nm in den Proben ermittelt. Während die Nukleinsäuren zwei Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm in einem Verhältnis von 2:1 aufweisen, haben Aminosäuren ihr Absorptionsmaxima bei 280 nm. Daraus ergibt sich bei Verunreinigungen der RNA mit Protein eine Ratio der OD 260 nm/OD 280 nm < 2.

Eine Ratio von  $\approx 1,8$  repräsentiert einen für unsere Zwecke akzeptablen Reinheitsgrad der RNA.

#### 2.2.4.4 Reverse Transkription der mRNA (cDNA Synthese)

Die reverse Transkription ist eine enzymatisch katalysierte Reaktion, in der die mRNA in cDNA übersetzt wird. Mit Hilfe einer RNA abhängigen DNA Polymerase, nämlich der reversen Transkriptase, wird dabei die mRNA in die komplementäre einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptase benötigt als Starterbereich für die Synthese der cDNA einen kurzen doppelsträngigen Nukleinsäurenbereich. Dies wird durch den Einsatz von Oligonukleotiden ermöglicht.

Die Oligo p (dt)<sub>15</sub> Primer lagern sich dem polyadenylierten Bereich (Poly A-Ende) der mRNA an und schreiben diese in 5' → 3' Richtung in die komplementäre cDNA um.

Die eingesetzten Reagenzien ermöglichen die Synthese von 4 µg cDNA:

- 8 µl 5 x RT-Puffer (Life Technologies)
- + 4 µl 100 mM DTT (Life Technologies)
- + 2 µl 50 pM Oligo p (dt)<sub>15</sub> Primer (Roche)
- + 2 µl 10 mM dNTP Mix (Roche)
- + 4 µg RNA.

Die Reagenzien wurden in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und auf 38 µl Gesamtvolumen mit sterilem Aqua dest. aufgefüllt. Die Proben wurden dann für 2 min bei 37°C zur Aufwärmung der Reagenzien inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl Enzym reverse Transkriptase (200 U/µl; Life Technologies). Die Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, deren Arbeitsoptimum bei 37°C liegt. Bei einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C erfolgte die reverse Transkription. Die synthetisierte cDNA stand als Template für die PCR direkt zur Verfügung.

## 2.2.5 Herstellung der Standard Fragmente

### 2.2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen cDNA-Fragmenten. Sie bietet den großen Vorteil der hohen Sensitivität und Spezifität des gezielten Nachweises von DNA Abschnitten. Die PCR ist eine enzymkatalysierte Kettenreaktion, bei der das Produkt aus dem vorangegangenen Amplifikationszyklus als Template für den nächsten Zyklus dient, woraus ein exponentieller Anstieg des Reaktionsproduktes resultiert. Bei hoher Produktkonzentration tritt in hohen Zyklenzahlen ein Sättigungsplateau auf.

Um DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotide. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrix (Template) sind. Hitzestabile DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrix und synthetisiert so neue DNA Stränge, deren Sequenz komplementär zu der Matrix ist. Die DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Für eine Wiederholung der Synthese muss man deshalb die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufschmelzen und nach Abkühlen der Mischung die Primer wieder binden lassen. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Somit setzt sich ein PCR Zyklus aus der Denaturierung des cDNA-Doppelstrangs, Anlagerung der spezifischen Primer an der Matrix-DNA (Annealing) und Verlängerung der Primer entlang der Matrix-DNA (Elongation) durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase zusammen. Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt. Dabei wurde für jede PCR zwei Reaktionsgemische (Reaktionsgemisch I: 1,0 µl 10mM dNTP-Mix, 0,5 µl 50 µM 5`-Primer, 0,5 µl 50 µM 3`-Primer, 2 µl cDNA, 20 µl deionisiertes Wasser und Reaktionsgemisch II: 5,0 µl 10 x Expand High Fidelity Puffer, 19,5 µl deionisiertes Wasser, 0,5 µl 3,5 U/µl Expand High Fidelity Enzym Mix) in ein 200 µl PCR-Tube vorpipettiert und unmittelbar vor Beginn der PCR vermischt.

Die Abbildung 2.1 verdeutlicht durch eine schematische Darstellung das Prinzip der PCR. Die DNA Amplifizierung erfolgte im Thermozykler (Gene Amp PCR System) unter den Bedingungen in Tabelle 2.1.

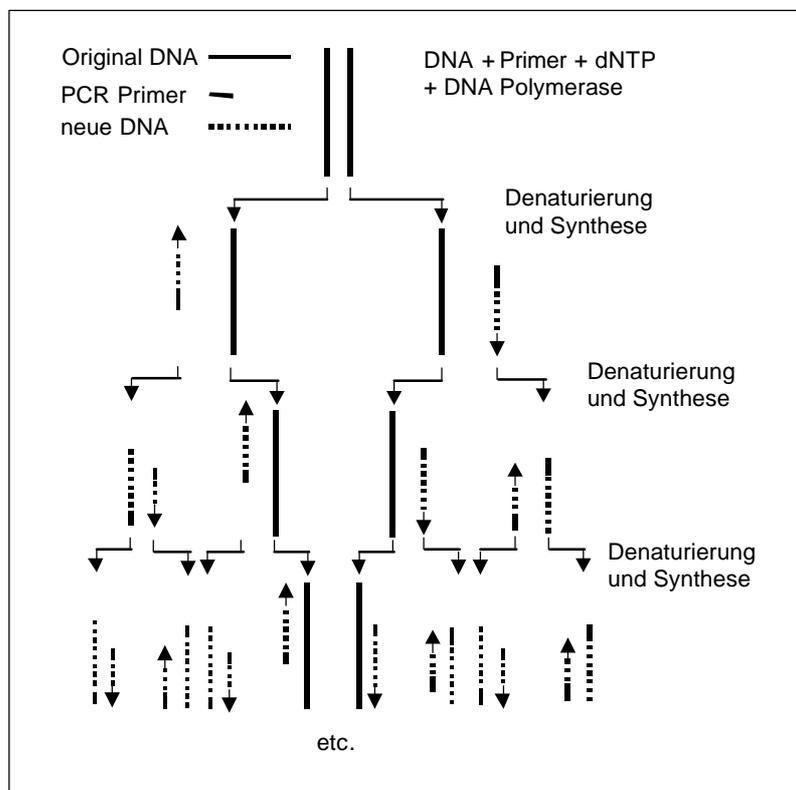
Tabelle 2.1: PCR Bedingungen

	<b>β-Aktin</b>	<b>IA-2</b>
Initiale Denaturierung	94°C für 2 min	94°C für 2 min
Denaturierung Annealing Elongation	94°C für 30 sec } 56°C für 30 sec } 27 Zyklen 72°C für 1 min }	94°C für 30 sec } 63°C für 30 sec } 29 Zyklen 72°C für 1 min }
Basenauffüllung	72°C für 6 min	72°C für 6 min

Tabelle 2.2: PCR-Primer

	<b>β-Aktin</b>	<b>IA-2</b>
Forward Primer	5`-CTA TCG GCA ATG AGC GGT TC-3`	5`-CTG GTG AAG TCT GAA CTG GAA G-3`
Reverse Primer	3`-GAG TTG GGG GTG GCT TTT G-5`	3`-CAG CAT AAC GAT GAC AGT GCA G-5`

Abbildung 2.1: Prinzip der Polymerasekettenreaktion



Die zu amplifizierende DNA wird durch Erhitzung denaturiert. In der Anwesenheit von DNA Polymerase und einem Überschuss an Nukleotiden und Primern, die spezifisch zu der Zielsequenz hybridisieren, kann ein neuer DNA Strang synthetisiert werden. In jedem Zyklus wird die Zahl der Kopien verdoppelt, so dass es zu einer exponentiellen Akkumulation des spezifischen DNA Produktes bis zum Erreichen der Plateauphase kommt.

### 2.2.5.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der DNA und ermöglicht die Spezifitätskontrolle der in der RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente. Zur Färbung der DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid verwendet. In einem elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe von der Kathode zur Anode. Um die Bedingungen für die Versuche konstant zu halten wurden die DNA-Fragmente in eine 1,8% Agarosegel mit 1 x TAE Laufpuffer aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarosegels verwendeten wir 1660 mg Agarose (Roche) und 90 ml 1 x TAE Puffer. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bis zum vollständigem Lösen der Agarose erhitzt und nach leichtem Abkühlen auf ca. 50°C wurde zu dem Gel 2 µl Ethidiumbromid gegeben. Die Agarose wurde dann in eine Midi-Gelelektrophoresekammer mit 20 Gel-Taschen zum Festwerden gegossen.

Nach Zugabe von 2 µl Gel-Loading Solutionpuffer zu den 25 µl PCR Proben wurden die Gel-Taschen gefüllt. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt und einer Gellaufzeit von 2 h.

Als DNA-Längenmarker diente der 100 bp Leiter (Life Technologies), um die Größe der RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente ablesen zu können.

Das Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA, wodurch die DNA unter UV-Licht fluoresziert und mit Hilfe des MWG Geldokumentationssystem und dem Lumi Imager (Roche) detektiert, photographisch dokumentiert und quantifiziert werden konnte.

### 2.2.5.3 Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Der Nukleo Trap Gel Kit (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland) ermöglicht die schnelle DNA-Fragment Extraktion aus Agarosegelen. Nach dem Ausschneiden der gesuchten Bande unter UV-Licht wurde die DNA in 300 µl NT1 Buffer aufgenommen, nach Zugabe von 4 µl NT Suspension konnte die DNA in der Gegenwart von chaotropen Salzen (Natriumjodid, Guanidinisothiocyanat, Natrium-perchlorat) gebunden werden. Danach fand eine Inkubation des Gemisches bei 50°C für 10 min statt. Zum Entfernen von Verunreinigungen wie z.B. Agarose, Proteine und Salze wurden insgesamt 4 Waschschriffe mit jeweils 2 x 500 µl NT Puffer 2 und 3 durchgeführt. Zum Schluss konnte die DNA in 50 µl TE Puffer (pH 8,0) eluiert werden.

#### 2.2.5.4 Ligation der DNA-Fragmente

Die Ligation ermöglicht den Einbau gereinigter DNA-Fragmente in Expressionsvektoren. Für die Versuche wurde das IA-2 Fragment in den pGEM-TEasy und das  $\beta$ -Aktin Fragment in den pGEM-4Z Vektor inkloniert. Zur Vorbereitung für die Ligation mussten die Vektoren einem Restriktionsverdau unterzogen werden, wobei der pGEM-TEasy mit dem Restriktionsenzym Bst X und pGEM-4Z mit Hinc II für 3 h bei 37°C verdaut wurde. Für den Ligationsansatz wurden 1  $\mu$ l 10 x Ligasepuffer, 0,5  $\mu$ l Plasmidklonierungsvektor, 2,5  $\mu$ l Chromatographiewasser, 5  $\mu$ l gereinigte DNA und 1  $\mu$ l Ligase benötigt. Ligiert wurde über Nacht bei 15°C.

#### 2.2.5.5 Transformation von E.coli Bakterien

Für die Transformation wurde 2  $\mu$ l des gewonnenen Ligationsansatzes und 0,7  $\mu$ l Mercaptoethanol (erhöht die Effizienz der Transformation) mit 200  $\mu$ l kompetenten E.coli (JM 109) vorsichtig in einem 2 ml Eppendorf Röhrchen gemischt.

Nach Inkubation des Gemisches für 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock für genau 45 sec. bei 42°C im Wasserbad. Durch anschließende Kühlung für 2 min auf Eis wurde durch die Einschleusung der Plasmide der Transformationsvorgang vollendet. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37°C in SOC Medium bei leichten kontinuierlichen Schüttelbewegungen (225 - 250 Umdrehungen/min) inkubiert. Am Schluss wurden 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf einer LB-Agar-Platte mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin, 0,5 mmol/l IPTG und 20  $\mu$ g/ml X-Gal mit einem Zellschaber gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die unter diesen Kultivierungsbedingungen ungefärbte Klone aufweisen, wurden erfolgreich mit dem ligierten Expressionsvektor und dem eingebauten DNA-Fragment transformiert, während die blau gefärbten Bakterienklone nur den religierten Vektor enthielten, der durch die Expression des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase das im Agar vorhandene X-Gal zu einem blauen Farbstoff spaltet. Dadurch war eine Selektion möglich. Die ungefärbten Klone konnten am nächsten Tag gepickt, in einem Falcon mit 5 ml LB Medium und 50  $\mu$ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 190 Umdrehungen/min inkubiert werden.

### 2.2.5.6 Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendeten wir den High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Die Bakterien wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Durch Anwesenheit von RNase A wird in diesem Schritt gleichzeitig die bakterielle RNA abgebaut. Nach Ausfällung von chromosomaler DNA und Zelltrümmern wird der plasmidhaltige Überstand mit dem High Pure Filter Tube gereinigt.

Die Nukleinsäuren wurden spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an eine Glasfaserflächenmembran gebunden. Nach Befreiung der Plasmide von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen wurden diese in Elutionspuffer eluiert. Nach Abzentrifugation der Bakteriensuspension wurde der Zelleniederschlag in 250 µl Suspensionspuffer aufgenommen und vollständig gelöst. Danach wurde 250 µl Lysepuffer zugegeben und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zugabe von 350 µl gekühltem und guanidinchloridhaltigem Bindungspuffer neutralisierte die Lysereaktion. Nach einer 5 minütlichen Inkubationszeit wurde das Gemisch für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und in ein High Pure Filtertube übertragen. Nach mehreren Waschvorgängen mit ethanolhaltigem Waschpuffer I und II wurden die Plasmide in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Zur Kontrolle der Plasmidisolierung erfolgte ein Restriktionsverdau bei 37°C über 3 h mit 1 µl 10 x Puffer B, 4 µl Chromatographiewasser, 4 µl Plasmid DNA, 0,5 µl Hind III und 0,5 µl EcoR I (β-Aktin Restriktionsverdauansatz), 1 µl 10 x Puffer D, 4,5 µl Chromatographiewasser, 4 µl Plasmid DNA und 0,5 µl Not I (IA-2 Restriktionsverdauansatz). Der Verdau wurde auf ein 2% Gel aufgetragen. Als Marker diente die 100 bp Leiter von der Firma Life Technologies.

### 2.2.5.7 Klonierung des internen Standards

Bei der Klonierung des internen Standards arbeiteten wir mit dem von Henihoff 1994 eingeführten Erase-a-Base System (Promega). Zunächst wurden die cDNA Klone im Insert mit Hinc II (β-Aktin) oder Ava I (IA-2) geschnitten.

Der Restriktionsverdau wurde gelelektrophoretisch überprüft, die DNA mit Phenolchloroform-Extrakt gereinigt, mit 3 M Natrium Acetat gefällt und nach einer erneuten Reinigung mit Ethanol in 10 µl Chromatographiewasser aufgenommen. Die gereinigte DNA konnte jetzt der Exonuclease III Deletion unterzogen werden.

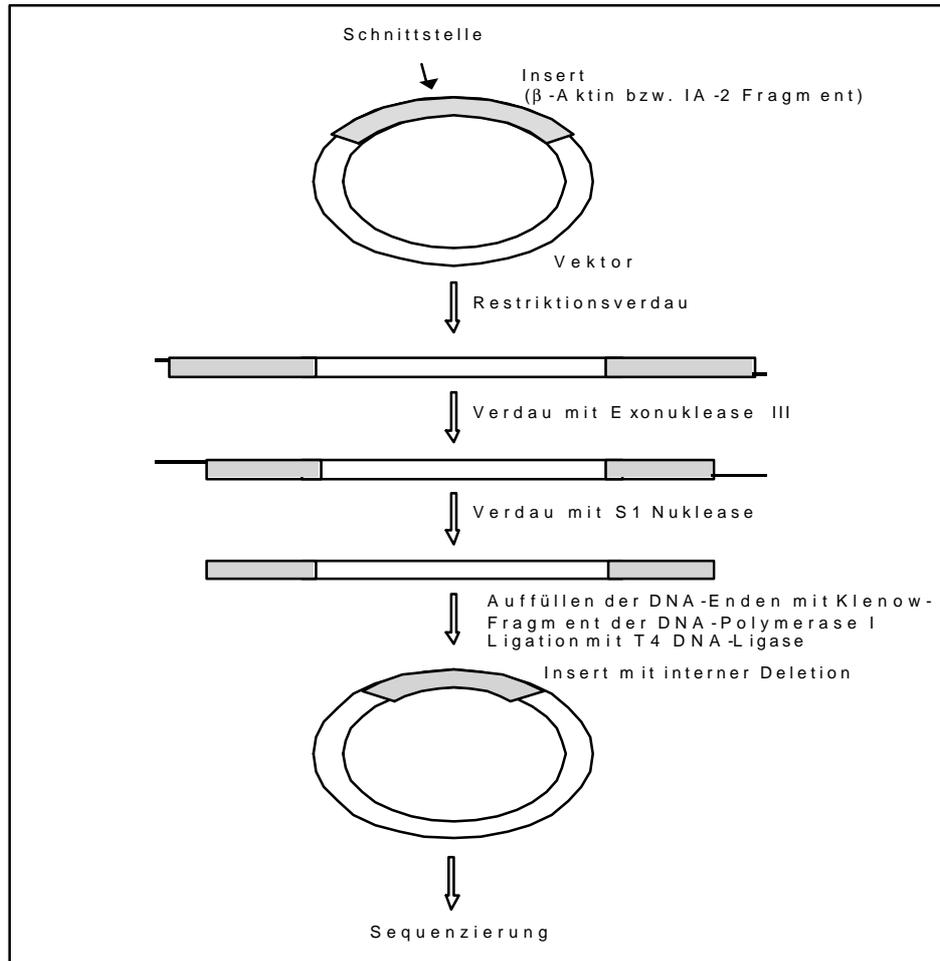
Durch Exonuklease III wurde zeit- und temperaturabhängig DNA an glatten oder 5`überhängenden Enden verdaut. Dazu wurden zwei Reaktionsmastermixe jeweils in 1,5 ml Eppendorftubes vorbereitet. Der S1 Nuklease Mastermix setzte sich aus 13,5 µl 7,4x Puffer, 0,6 µl S1 Nuclease (= 30,0 Units) und 86,0 µl Chromatographiewasser zusammen. Der Exo III Deletion Mastermix enthielt 10,0 µl Plasmid, 2,0 µl Exo III 10 x Puffer und 7,0 µl Chromatographiewasser.

Der S1 Nuclease Mastermix wurde dann in 4 vorgekühlte 0,5 ml Eppendorftubes zu jeweils 7,5 µl Gesamtvolumen verteilt und auf Eis inkubiert, um die Aktivierung der S1 Nuklease zu verhindern. Zu dem Exo III Deletion Mastermix wurde zum Starten der Exonukleasereaktion 1,0 µl Exo III gegeben. In jeweils 15 sec Takt wurden insgesamt 4 Aliquots zu jeweils 2,5 µl des Mastermixes entnommen und mit dem 7,5 µl der S1 Nukleasemixtur zugegeben. Hierdurch wurde die Exo III Enzymaktivität gestoppt.

Durch Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min konnte das S1 Nuklease Enzym aktiviert werden, so dass der verbliebene zweite Einzelstrang der doppelsträngigen DNA verdaut wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl S1 Nuklease Puffer beendet. Die Proben wurden mit 3,0 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 20 µl 100% Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt, mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und das bei Raumtemperatur für 5 min getrocknete Pellet in 22 µl Chromatographiewasser eluiert. Das Gesamtvolumen von 22 µl der gelösten DNA wurde mit 1 µl der dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 3 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl Klenow Polymerase und 70 µl Chromatographiewasser vermischt und für 5 min bei 37° C inkubiert. Die Klenow Polymerase kann bei diesen Bedingungen die DNA-Enden glätten und die Religation ermöglichen.

Die Inaktivierung der Polymerase erfolgte durch eine Inkubation der Proben für 10 min bei 60°C. Die DNA wurde danach erneut einer Reinigung mittels Phenolchloroform unterzogen und in 15 µl Chromatographiewasser aufgenommen. Die gereinigte DNA wurde mit 4 µl 5 x Reaktionspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase über Nacht bei 15 °C religiert. Nach der Transformation wurden für jeden der 4 Zeitpunkte jeweils 2 Bakterienklone gepickt. Nach Inkubation über Nacht in 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin wurden die Plasmide isoliert und durch einen Restriktionsverdau mit Hind III und EcoR I (β-Aktin Fragment) und Not I (IA-2 Fragment) überprüft. Zum Abschluss wurden die erstellten Kontrollfragmente sequenziert. Wir erhielten nach einem Verdau von 45 sec für das IA-2 ein Fragment mit internen Deletion von 100 bp bzw. nach 60 sec für das β-Aktin ein um 144 bp kürzeres Fragment.

Abbildung 2.2: Klonierung der Kompetitorfragmente



**Erstellung des internen Standards mittels des Erase-a-Base-Systems.** Nach einem Restriktionsverdau wurde die linealisierte Plasmid DNA mit dem Exo III Enzym inkubiert. Dieses Enzym verdaut in regelmäßiger Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur an den 5' überhängendem Ende der DNA. Die Nuklease S1 verdaut dann den 2. Einzelstrang. Um die Religation zu ermöglichen wurden die DNA-Enden mit der Klenow-Polymerase geglättet.

### 2.2.5.8 Herstellung der Kompetitorfragmente

Durch den Restriktionsverdau mit Bst X I bei IA-2 und EcoR I bei  $\beta$ -Aktin für 3 h bei 37°C wurden 85 bis 106  $\mu$ g der Plasmide, die die interne Deletion enthalten, linearisiert. Danach wurde 4  $\mu$ l des Plasmids zusammen mit Life Technologies Quantifizierungsstandards (15 bis 500 ng/ $\mu$ l) auf ein 1% Agarosegel und 1  $\mu$ l Ethidiumbromid aufgetragen und mit dem Geldokumentationssystem photographisch dokumentiert. Die Plasmidkonzentration wurde dann mit dem Lumi Analyst Programm im Vergleich zu den Quantifizierungsstandards ermittelt und mittels folgender Formel am Beispiel von IA-2 die Standards eingestellt:

pGEM-TEasy Vektor + Kontrollfragment: 3018 bp + 722 bp = 3740 bp

1 pmol von 1000 bp = 0,66 µg;

1 pmol von 3740 bp = 0,66 µg \* 3,740 = 2,4684 µg.

Mittels der Quantifizierungsstandards konnte für den internen Standard eine Konzentration von 27,81 ng/µl ermittelt werden.

Wenn 1 pmol von 3740 bp 2,4684 µg (2468,4 ng) entsprechen, dann kann mit Hilfe des Dreisatzes die Konzentration von 3740 bp in 27,81 ng errechnet werden:

$$2468,4 \text{ ng} / 1 \text{ pmol} = 27,81 \text{ ng} / x$$

$$x = (27,81 \text{ ng} * 1 \text{ pmol}) / 2468,4 \text{ ng} = 0,01126 \text{ pmol}$$

Im nächsten Schritt wurde der Vektor herausgerechnet:

$$722 \text{ bp} / 3740 \text{ bp} = 0,193, \text{ d.h. } 0,01126 \text{ pmol} * 0,193 = 2,173 \text{ fmol}/\mu\text{l}$$

Es folgte die Verdünnung des Kompetitorfragments auf ein fmol/µl. Durch Verdünnung in Zehner Schritten wurde mit Hilfe der PCR die Konzentration bestimmt, bei der gerade noch eine schwache Bande auf dem 1,8% Agarosegel zu sehen ist. Diese Konzentration wurde dann als 1 AU (arbitrary unit) definiert.

### 2.2.5.9 DNA-Sequenzierung

Alle klonierten cDNA-Fragmente wurden sequenziert. Für die Sequenzierung wurde ein automatisches Sequenziersystem (ABI 310, PE Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Das Prinzip basiert auf einer nicht-radioaktiven Markierung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen. Dabei wurde die mit dRhodamin-Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA während der Kapillarelektrophorese vom Gerät mittels Laser angeregt und gemessen. Für die Sequenzier-PCR wurde der BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem) eingesetzt. Der Kit enthält Puffer, Magnesiumchlorid, DNA Polymerase, dNTPs und dRhodamin-markierte ddNTPs. Für den PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien zusammen in ein 0,2 µl PCR-Tube pipettiert: 3,5 µl Bigdye Terminator Ready Reaction Mix, 500 ng mit High Pure Plasmid Isolation Kit gereinigte DNA-Template, 3 pmol Primer (1. Reagenzansatz mit M13 Forward-Primer und 2. Reagenzansatz mit M13 Reverse-Primer) und dann in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 10 sec bei 96°C (Denaturierung), 5 sec bei 50°C (Primer-Annealing) und 4 min bei 60°C (Elongation) mit insgesamt 26 Zyklen. Nach der PCR wurden die PCR-Produkte mittels Ethanolpräzipitation gereinigt.

Zur Fällung wurden zu 20 µl PCR-Amplikon 20 µl deionisiertes Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl 100% Ethanol hinzupipettiert und nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis für 15 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde darauffolgend mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur für etwa 7 min getrocknet, in 20 µl Template Suppression Puffer (PE Applied Biosystems) reeluiert und letztendlich für 2 min bei 95°C denaturiert. Die mit dRhodamin markierte DNA wurde im ABI 310 Sequenziersystem in einer Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und die Nukleotidsequenz mittels Detektion der Laser induzierte Fluoreszenz bestimmt.

Die Sequenzen wurden nach der Sequenzanalyse mit der Gen-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) verglichen. Dabei stimmten die Sequenzen 100% mit den veröffentlichten Originalsequenzen für IA-2 (bp 1642 - 2463; Genbank Accession Nummer D38222) und β-Aktin (bp 827 - 1583; Genbank Accession Nummer V01217) überein.

### **2.2.6 Northern Blot Analyse**

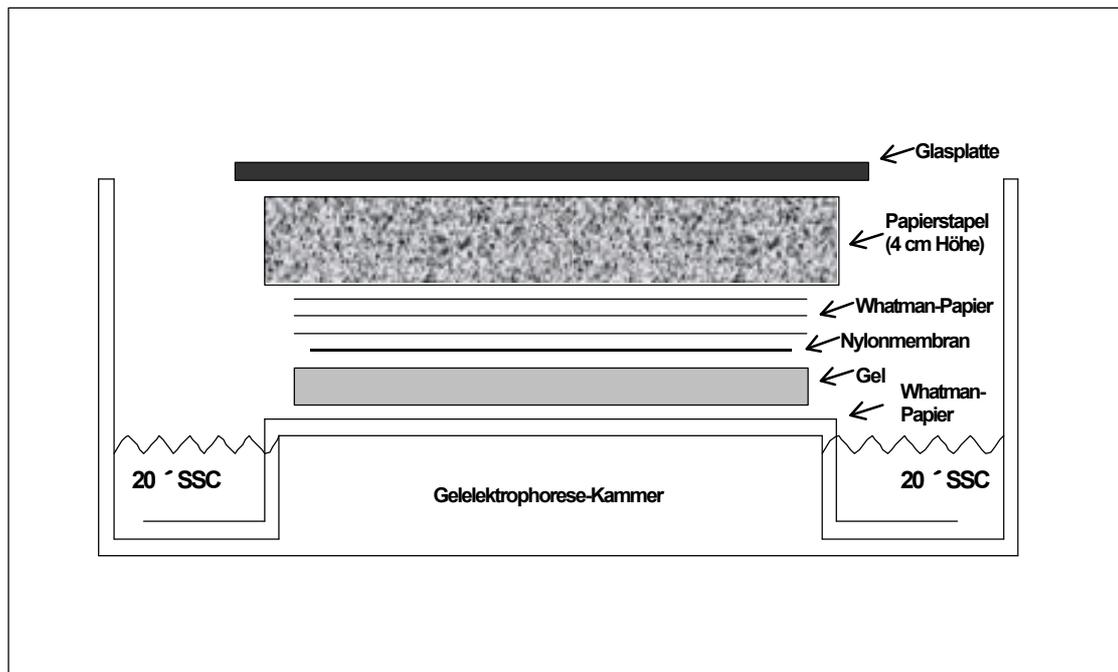
Die Northern Blot Analyse ist eine konventionelle Methode zur Nachweis der mRNA Expression.

Für den Northern Blot wurden 4 µg gesamt RNA in 4 Volumina RNA-Probenpuffer für 10 min bei 65°C denaturiert, auf ein 1% Agarosegel mit 5% Formaldehyd aufgetragen und elektrophoretisch in 1 x MOPS RNA-Elektrophoresepuffer für 3 h bei 90 V aufgetrennt. Es folgte zum Auswaschen des Formaldehyds aus dem Gel ein drei stündiges Einlegen des Gels in DEPC-vorbehandeltem Wasser. Durch Kapillartransfer wurde die RNA über Nacht auf einer Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham, Braunschweig, Deutschland) geblottet und darauffolgend mit DIG Easy Hyb Lösung für 2 h bei 68°C vorhybridisiert. Die Proben wurden simultan mit einem Digoxigenin (DIG)-markierten 822 bp Ratten IA-2 und 757 bp β-Aktin cDNA Fragment in dem selben Blot für 18 h bei 68°C in DIG Easy Hyb Lösung hybridisiert. Die Membranen wurden 2 x mit Sodium Chlorid-Sodium Zitrat (SSC) (300 mmol/l NaCl, 30 mmol/l C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>, pH 7,0), 0,1 % SDS bei Raumtemperatur, und 2 x mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 68°C zum Herauswaschen der nicht gebundenen Sonden gereinigt.

Zuletzt wurde die Expression von IA-2 und  $\beta$ -Actin durch Inkubation der Membranen mit einem Anti-DIG alkalische Phosphatase markierten Antikörper und CSPD-Chemilumineszenz-Substrat detektiert.

Die Chemilumineszenz wurde mittels Lumi Imager detektiert und quantifiziert.

Abbildung 2.3 : Aufbau des Blot-Sandwiches für den Kapillartransfer von RNA.



## 2.2.7 Aufbau und Optimierung der quantitativen kompetitiven RT-PCR

### 2.2.7.1 Aufbau der quantitativen RT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen kompetitiven RT-PCR kann die Genexpression von Zielgenen aus der isolierten und revers transkribierten mRNA ermittelt werden. Die Methode basiert auf der Anwesenheit eines exogen synthetisierten Standards (Kompetitorfragment), dessen Kopienzahl bekannt ist, und der zusammen mit dem Target in einer PCR koamplifiziert wird. Die Erstellung einer Verdünnungsreihe des Standards ermöglicht die Bestimmung der exakten Kopienzahl des Targets.

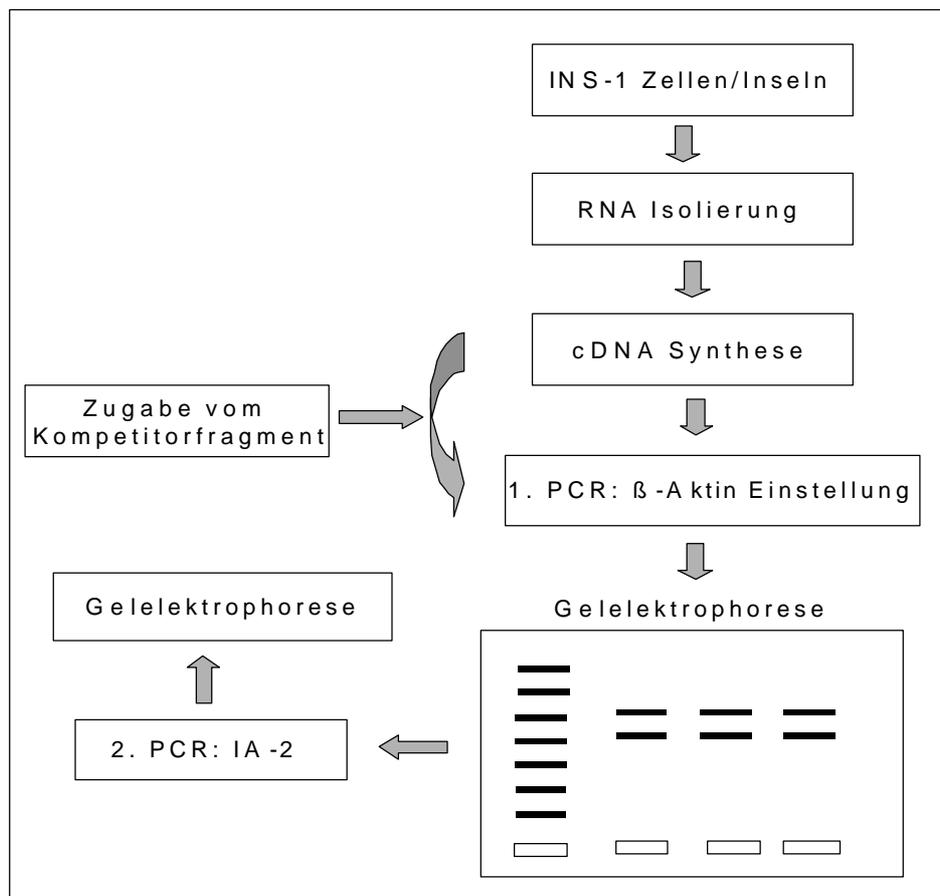
Eine optimale Einstellung liegt dann vor, wenn das Verhältnis cDNA : Kompetitor 1 : 1 beträgt. Der Standard ist so konzipiert, dass Standard und Target die identische Primerbindungsstellen besitzen und sich aber trotzdem durch Ihre Größendifferenz im Agarosegel unterscheiden lassen.

In der vorliegenden Studie unterscheiden sich die Kompetitorfragmente von der zu untersuchenden DNA nur in der Länge von 100 – 144 bp bei komplett identischem 5` und 3` Primerbindungsstellen.

Da Unterschiede in der Isolierung der RNA und der Transkription in cDNA die kompetitive RT-PCR stark beeinflussen, müssen alle Proben auf den gleichen mRNA/cDNA Gehalt eingestellt werden. Dies wurde mit einem housekeeping Gen ( $\beta$ -Aktin) durchgeführt.

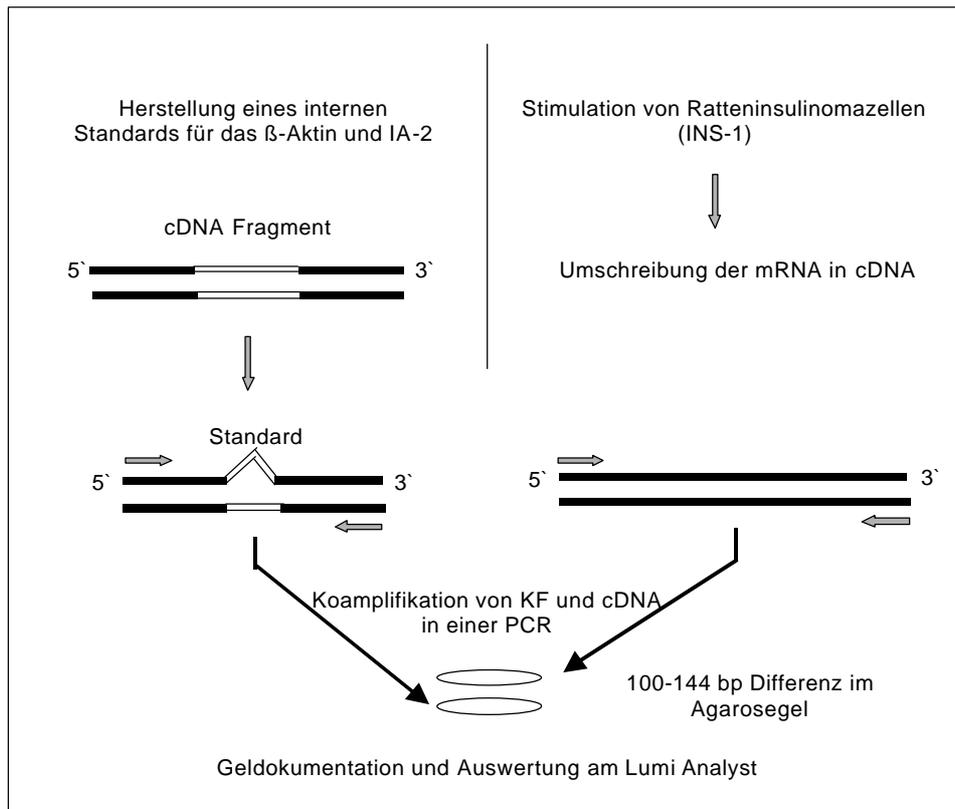
Die Quantifizierung erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte durch Bestimmung des Verhältnisses cDNA zu Kompetitor mit dem Lumi Imager System.

Abbildung 2.4: Schema der quantitativen kompetitiven RT-PCR



Nach der Isolierung der RNA wurde die RNA durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Zusammen mit den Standards bekannter Konzentration werden die Proben in der ersten PCR mit Hilfe des housekeeping Gens  $\beta$ -Aktin auf die gleiche cDNA Konzentration justiert. In der zweiten PCR wird dann die Expression des spezifischen Gens untersucht.

Abbildung 2.5: Untersuchung der Regulation der IA-2 mRNA Expression mittels der quantitativen kompetitiven RT-PCR



Nach Stimulation von Ratteninsulinomazellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zusammen mit den synthetisierten internen Standards wurde die cDNA in einer PCR koamplifiziert. In der ersten PCR wurde mit Hilfe des β-Aktins auf die gleiche cDNA Konzentration eingestellt und danach folgte die IA-2 PCR. Da zwischen cDNA und Kontrollfragment eine Längendifferenz von 100 bp (IA-2) und 144 bp (β-Aktin) bestand, konnten sie im Elektrophoresegel getrennt werden. Die Geldokumentation erfolgte mit dem Lumi Imager.

### 2.2.7.2 Optimierung der quantitativen RT-PCR

Um die PCR möglichst effektiv zu gestalten wurden die PCR Bedingungen ( $MgCl_2$  Konzentration, Primerkonzentration und PCR-Zyklen) in Vorversuchen optimiert.

Hierzu wurden in einem 0,2 ml dünnwandigen PCR-Tube 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3), 200 µmol/l PCR Nukleotide Mix (10 mmol/l dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1,0 µmol/l forward Primer, 1,0 µmol/l reverse Primer, 0,1 µg cDNA und 0,86 U High Fidelity DNA Polymerase gegeben. Zu den Proben wurden 0,003 fmol β-Aktin Kontrollfragment bzw. 0,00005 fmol IA-2 Kontrollfragment gegeben und auf 25 µl mit sterilem PCR Wasser aufgefüllt.

Zur Optimierung der PCR-Zyklen wurden 5 identische Proben erstellt und im Thermozykler amplifiziert. In Abständen von 2 Zyklen ab 23 Zyklen bei  $\beta$ -Aktin bzw. 25 Zyklen bei IA-2 wurde die Amplifikation gestoppt und die Amplikons gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf diese Weise konnte der optimale PCR-Zyklus mit exponentielle Amplifikation als auch die Plateauphase ermittelt werden.

### 2.2.7.3 Berechnung der Stimulationsindices

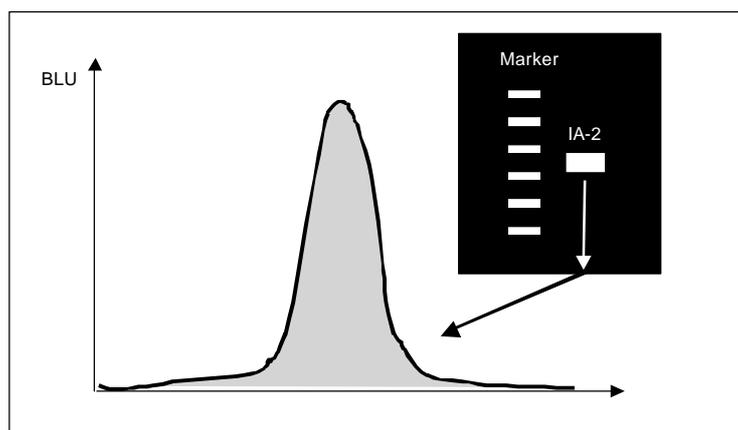
Um den Stimulationsfaktor der IA-2 mRNA Expression zu berechnen, wurde wie folgt vorgegangen.

Im ersten Schritt wurde die  $\beta$ -Aktineinstellung nach Auswertung des Agarosegels für die basale und stimulierte Zellen mittels Lumi Analyst beurteilt und in BLU umgerechnet:

$$(1) \frac{\beta\text{-Aktin cDNA stimuliert (BLU)}}{\beta\text{-Aktin KF stimuliert (BLU)}} \bigg/ \frac{\beta\text{-Aktin cDNA Basal (BLU)}}{\beta\text{-Aktin KF Basal (BLU)}}$$

Dieser Quotient sollte optimal 1 ergeben, so dass die PCR so lange wiederholt wurde bis der Quotient mindestens zwischen 0,90 bis 1,10 lag. Bei dieser Einstellung ist der cDNA Gehalt der Proben nahezu identisch, so dass im 2. Schritt die Höhe der IA-2 Expression direkt verglichen werden konnte.

Abbildung 2.6: Definition von Boehringer Light Unit



Boehringer Light Unit (BLU) ist eine relative Lichteinheit, die sich aus dem Integral der Lichtintensität unter der Meßkurve ergibt. Sie stellt somit die densitometrische Bestimmung der Bandenintensität dar. Gemessen wird diese Intensität mit dem Lumi Imager.

Anschließend erfolgt die Berechnung der IA-2 Expression durch Bestimmung des Stimulationsfaktors:

$$(2) \frac{\text{IA-2 cDNA stimuliert (BLU)}}{\text{IA-2 KF stimuliert (BLU)}} \bigg/ \frac{\text{IA-2 cDNA Basal (BLU)}}{\text{IA-2 KF Basal (BLU)}}$$

### 2.2.8 Analyse der Regulation der IA-2 mRNA Expression

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist das Autoantigen IA-2 in den Insulinsekretionsgranula und sekretorischen Granula verschiedener neuroendokriner Zellen lokalisiert. Die Bedeutung von IA-2 für Betazellen und die Regulation von IA-2 war bisher weitgehend unbekannt. Um die Regulation von IA-2 zu analysieren, wurden Inselzellen mit ausgewählten Stimulantien behandelt. Die Konzentrationen waren aus vorausgehenden Studien so gewählt, dass ein signifikanter Effekt auf die Betazellfunktion zu erwarten war und toxische Effekte ausgeschlossen werden konnten. Nach Abschluss der Stimulationsphase wurde die Vitalität der Zellen mittels der Trypanblaufärbung überprüft. Dabei konnte in allen Experimenten > 95% der Zellen als vital identifiziert werden.

#### 2.2.8.1 cAMP und PKC Signaltransduktionskaskade

Zyklisches AMP, Kalziumionen, Phosphoinositol Metaboliten (Inositoltriphosphat und Diacylglycerol) und Arachidonsäure fungieren als intrazelluläre Signalboten für die Regulation der Insulinsekretion. Sie haben außerdem Bedeutung bei Kontrolle der Zellteilung und Proliferation von Inselzellen.

Unsere Untersuchungen zur Regulation der IA-2 mRNA Expression beschränkten sich auf die cAMP und PKC Signaltransduktionskaskade. Verwendet wurden Forskolin, IBMX und PMA.

*Forskolin* (7 $\beta$ -Acetoxy-1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 9 $\alpha$ -trihydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-on) ist ein gefäßerweiterendes und blutsenkendes Diterpenoid (C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>) aus der indischen Heilpflanze *Coleus forskolii*. Seine Wirkung beruht auf einer Stimulierung der Adenylatzyklase, was zu einem direkten Anstieg der intrazellulären Konzentration an cAMP führt.

Das *IBMX* (3-Isobutyl-1-Methylxanthine) ist ein Methylxanthinderivat. Es ist ein indirekter cAMP Agonist, indem es die Phosphodiesterase und damit den Abbau von cAMP hemmt.

Der *Phorbol ester* PMA (Phorbol 12 Myristate 13-Acetate) aktiviert bei kurzen Inkubationszeiten (bis 16 Stunden) durch seine Ähnlichkeit zu Diacylglycerin die Proteinkinase C. Bei längerer Inkubationszeit wird die Proteinkinase C gehemmt.

Zur Stimulierung mit Forskolin, IBMX und PMA wurden INS-1 Zellen für 3 Tage im basalen Komplettmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml frischem Komplettmedium und Forskolin (10  $\mu\text{mol/l}$ ), 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (100  $\mu\text{mol/l}$ ) oder Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (1  $\mu\text{mol/l}$ ) für 6 – 48 Stunden stimuliert.

### 2.2.8.2 Regulation der IA-2 Expression durch Glukose und Hormone

Um den Einfluss von metabolischen und hormonellen Stimulantien auf die IA-2 Expression zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen mit Glukose (10, 15 und 21  $\text{mmol/l}$ , 6 h - 144 h), Glukagon (1 und 10  $\mu\text{mol/l}$ , 24 h) und Somatostatin (S-14) (1 und 10  $\mu\text{mol/l}$ , 24 - 48 h) behandelt.

Das *Glukagon*, ein Peptidhormon mit 29 Aminosäuren, ist der direkte Gegenspieler des Insulins und wird in den Alphazellen der Langerhans'schen Inseln synthetisiert.

Glukagon aktiviert die Adenylatzyklase und vermittelt seine Wirkung hauptsächlich durch den cAMP Signalweg.

*Somatostatin* ist ein Peptidhormon mit 14 (S-14) und 28 Aminosäuren AS (S-28), das in den Deltazellen der Langerhans'schen Inseln, im Hypothalamus, zentralem und peripherem Nervensystem exprimiert wird. In den Langerhans'schen Inseln wirkt Somatostatin über einen parakrinen Mechanismus hemmend auf die Insulin- und Glukagonsekretion. Die Bindung von Somatostatin führt zur Aktivierung von membrangebundenen G-Proteinen, die die Bildung von cAMP erniedrigen und intrazelluläre Kalziumkonzentration reduzieren.

### 2.2.8.3 Einfluss von Sulfonylharnstoff und Diazoxid auf die IA-2 Expression

Es wurde der Einfluss des Sulfonylharnstoffs Glibenclamid (5 µg/ml, 24 und 72 h) und Diazoxid (22,5 µg/ml, 24 und 72 h) auf die IA-2 mRNA Expression untersucht, da diese beiden Medikamente die Insulinsekretion beeinflussen.

Die oralen Antidiabetika vom *Sulfonamid-Typ* blockieren die ATP-sensitiven K<sup>+</sup> Kanäle. Dadurch kommt es zu einem intrazellulären Kalziumeinstrom und zur Insulinsekretion aus den Betazellen.

*Das Diazoxid* bewirkt durch Aktivierung der ATP-sensitiven K<sup>+</sup> Kanäle eine Hemmung der Insulinsekretion.

### 2.2.9 Statistik

Für alle Analysen wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SD angegeben. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem gepaarten Student` t-Test. Ein Unterschied wurde bei einem p Wert < 0,05 als signifikant betrachtet.

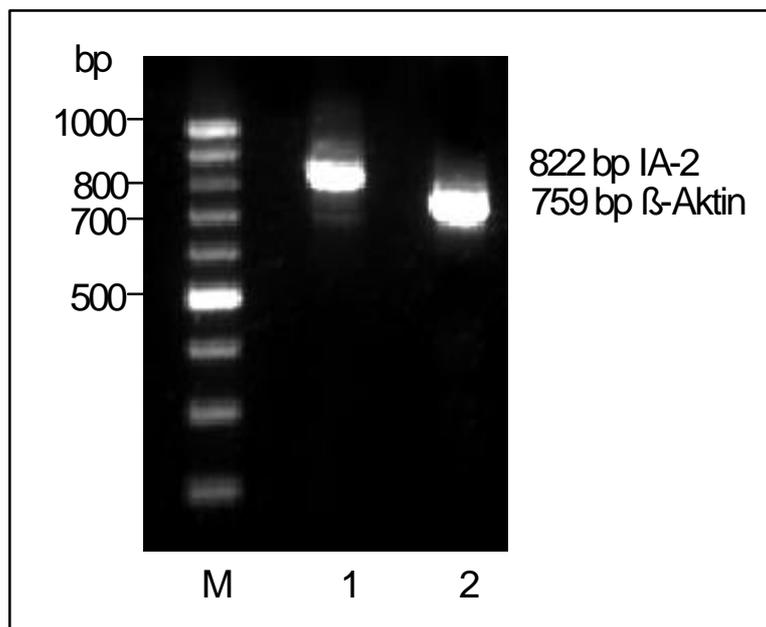
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung und Optimierung der quantitativen kompetitiven RT-PCR

##### 3.1.1 Nachweis der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen

Zum Nachweis der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen wurden nach Kultivierung der Zellen in RPMI 1640 Medium mit 7 mM Glukose die Gesamt-RNA isoliert, mittels der reversen Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in einem Thermozykler amplifiziert. Nach einer Amplifikation von 27 Zyklen bei  $\beta$ -Aktin und 29 Zyklen bei IA-2 wurde die PCR Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl die  $\beta$ -Aktin als auch die IA-2 mRNA lässt sich bei den ausgewählten optimierten PCR Bedingungen in hohen Konzentrationen detektieren. Somit konnte die Untersuchung der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen durchgeführt werden.

Abbildung 3.1: Nachweis der  $\beta$ -Aktin und IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen

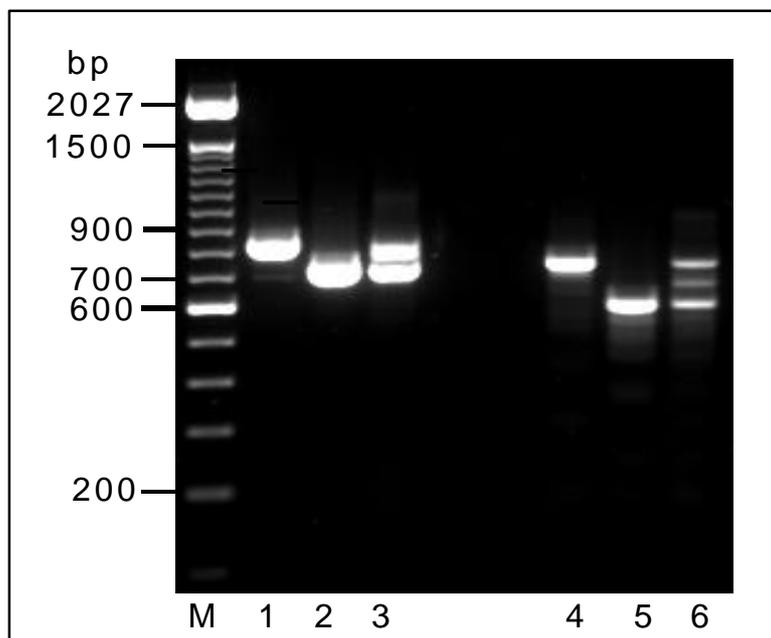


M = 100 bp Marker, Spur 1 = IA-2 (822 bp) und Spur 2 =  $\beta$ -Aktin (759 bp). Nach der Amplifikation von 27 PCR-Zyklen ( $\beta$ -Aktin) und 29 Zyklen (IA-2) konnte die Expression beider Gene in INS-1 Zellen nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Synthese der internen Standards

Um die Regulation der IA-2 mRNA Expression quantitativ auswerten zu können, wurde die quantitative kompetitive RT-PCR etabliert. Abbildung 3.2 zeigt die Kompetitorfragmente nach interner Deletion von 100 bp (IA-2) bzw. 144 bp ( $\beta$ -Aktin). Die Deletionen und der Erhalt der Primerbindungsstellen wurden durch Sequenzierung dokumentiert. Nach der Auftrennung im Agarosegel war es möglich die Kompetitorfragmente von der Original cDNA zu differenzieren.

Abbildung 3.2: Synthese der internen Standards

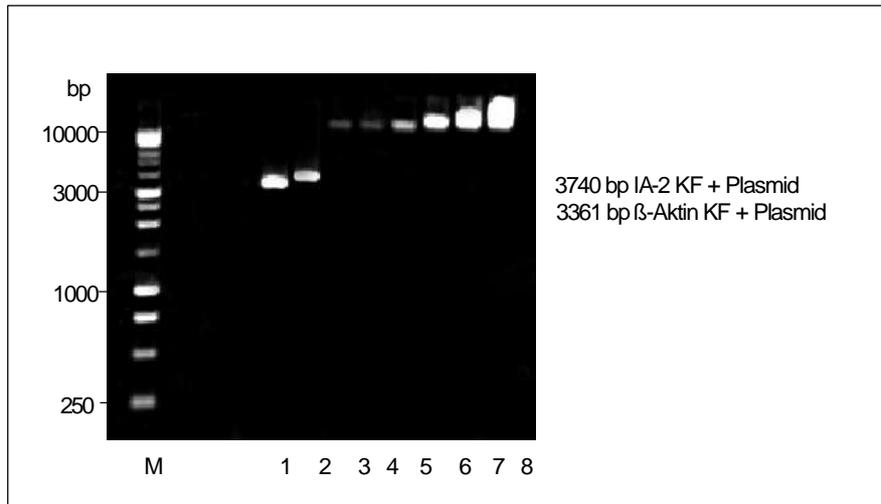


**M = 100 bp Marker, Spur 1 = nur IA-2 cDNA mit einer Länge von 822 bp, Spur 2 = nur IA-2 KF mit einer verkürzten Länge von 722 bp, Spur 3 = Koamplifikation von IA-2 cDNA mit dem KF, wobei die beiden Fragmente sich um 100 bp voneinander unterscheiden, Spur 4 = nur  $\beta$ -Aktin cDNA mit einer Länge von 759 bp, Spur 5 = nur  $\beta$ -Aktin KF mit einer Länge von 615 bp und Spur 6 = Koamplifikation der  $\beta$ -Aktin cDNA mit dem KF, Größendifferenz der beiden Fragmente von 144 bp.**

### 3.1.3 Einstellung der internen Standards

In der quantitativen kompetitiven RT-PCR wurde die zu untersuchende Ziel cDNA unbekannter Konzentration mit einem Kontrollfragment bekannter Konzentration koamplifiziert.

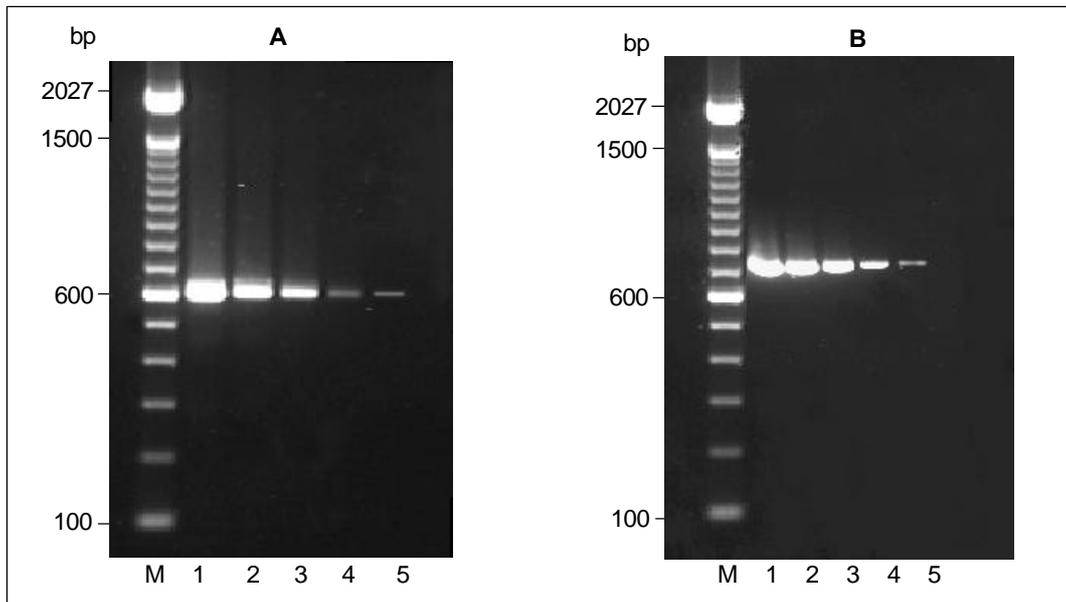
Abbildung 3.3: Konzentrationsbestimmung der internen Standards



M = 1 kbp Marker, Spur 1 =  $\beta$ -Aktin KF mit einer Gesamtlänge von 3361 bp, die ermittelte Konzentration beträgt 141,25 ng in 4  $\mu$ l; Spur 2 = IA-2 KF mit einer Gesamtlänge von 3740 bp, die hierfür ermittelte Konzentration beträgt 111,24 ng in 4  $\mu$ l; Spur 3 - 8 Quantifizierungsstandards: Spur 3 = 15 ng, Spur 4 = 31 ng, Spur 5 = 63 ng, Spur 6 = 125 ng, Spur 7 = 250 ng und Spur 8 = 500 ng.

Für das IA-2 Kontrollfragment wurde eine Konzentration von 27,81 ng/ $\mu$ l und für das  $\beta$ -Aktin Kontrollfragment 35,31 ng/ $\mu$ l berechnet. Nach der im Kapitel 2.2.5.7 beschriebenen Formel wurden die Kontrollfragmente zunächst auf 1 fmol/ $\mu$ l verdünnt. Dann erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe in jeweils 1:10 Verdünnungsschritten. Die verdünnten Plasmide wurden in der PCR amplifiziert und das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.4). Aufgetragen wurden 1  $\mu$ l der verdünnten Standards. Dabei konnten wir bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  fmol/ $\mu$ l des IA-2 Kontrollfragmentes nach 29 Zyklen und von  $10^{-6}$  fmol/ $\mu$ l des  $\beta$ -Aktin Kontrollfragmentes nach 27 Zyklen PCR-Amplifikation die gesuchten Banden gerade noch im Agarosegel detektieren. Diese Konzentrationen entsprachen gemäß unserer Definition jeweils ein arbitrary unit (AU).

Abbildung 3.4: Einstellung der internen Standards



**A:** M = 100 bp Marker, Spur 1 - 5  $\beta$ -Aktin KF Verdünnungsreihe: Spur 1 =  $10^2$  fmol/ $\mu$ l, Spur 2 =  $10^3$  fmol/ $\mu$ l, Spur 3 =  $10^4$  fmol/ $\mu$ l, Spur 4 =  $10^5$  fmol/ $\mu$ l, Spur 5 =  $10^6$  fmol/ $\mu$ l = 1 AU; **B:** M = 100 bp Marker, Spur 1- 5 IA-2 KF Verdünnungsreihe: Spur 1 =  $10^3$  fmol/ $\mu$ l, Spur 2 =  $10^4$  fmol/ $\mu$ l, Spur 3 =  $10^5$  fmol/ $\mu$ l, Spur 4 =  $10^6$  fmol/ $\mu$ l, Spur 5 =  $10^7$  fmol/ $\mu$ l = 1 AU.

### 3.1.4 Ermittlung der Plateauphase zur Optimierung der quantitativen RT-PCR

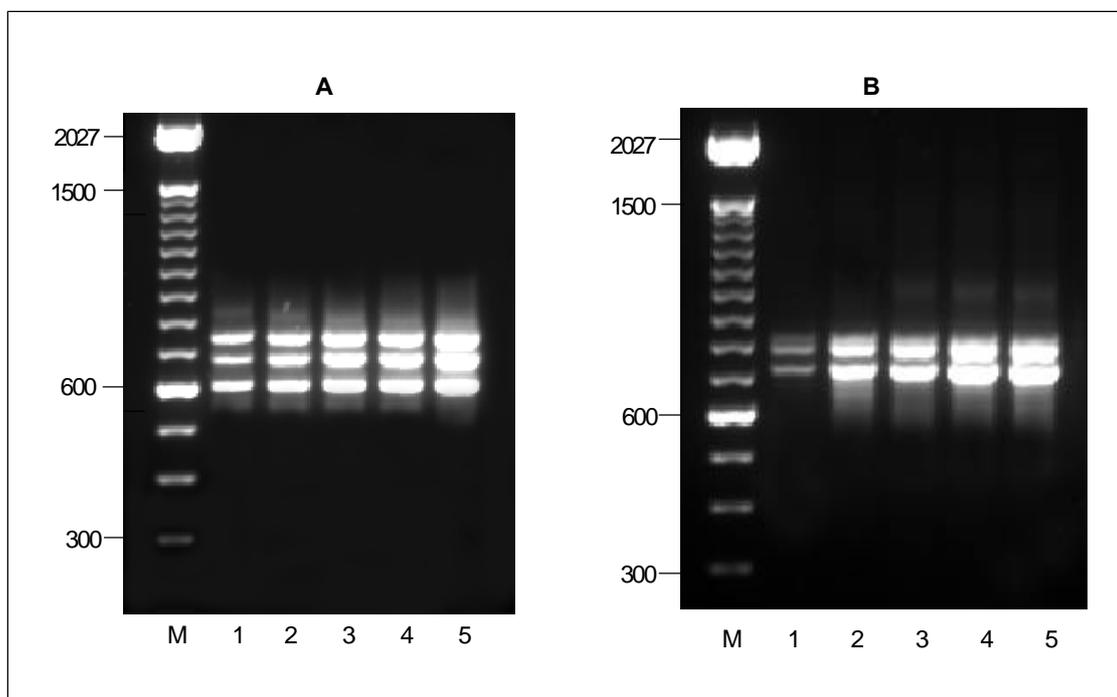
Die benötigten Reagenzien für die PCR außer cDNA und Kontrollfragment wurden in einem Mastermix zusammen pipettiert und dann in 5 gleichmäßige Proben verteilt. Für die  $\beta$ -Aktin PCR wurde zu jeder der 5 Proben jeweils 1,0  $\mu$ l der umgeschriebenen cDNA und 0,003 fmol  $\beta$ -Aktin Kontrollfragment zugegeben und dann in einem Thermozyklerlauf amplifiziert. Dasselbe Schema wurde ebenfalls für die IA-2 PCR mit 1,0  $\mu$ l cDNA und 0,00005 fmol IA-2 Kontrollfragment angewandt. Ab 23 Zyklen bei  $\beta$ -Aktin und 25 Zyklen bei IA-2 wurden in Abständen von jeweils 2 Zyklen die PCR Produkte aus dem Thermozykler entnommen und zusammen auf einem Agarosegel aufgetragen.

Das  $\beta$ -Aktin konnte bereits nach 23 Zyklen nachgewiesen werden, während sich IA-2 als spezifisches Gen nur schwach detektieren liess. Als optimaler Amplifikationszyklus wurde für die  $\beta$ -Aktin PCR 27 Zyklen und für die IA-2 PCR 29 Zyklen ausgewählt, da sowohl cDNA als auch Kontrollfragment in diesem Bereich sich noch exponentiell amplifizieren lassen und die Expression beider Gene deutlich detektiert werden konnte.

Mit zunehmender Zyklenzahl, nämlich ab 31 Zyklen konnte insbesondere für die IA-2 PCR eine Plateauphase beobachtet werden, bei dem Template und Kontrollfragment nicht mehr exponentiell amplifiziert werden konnten.

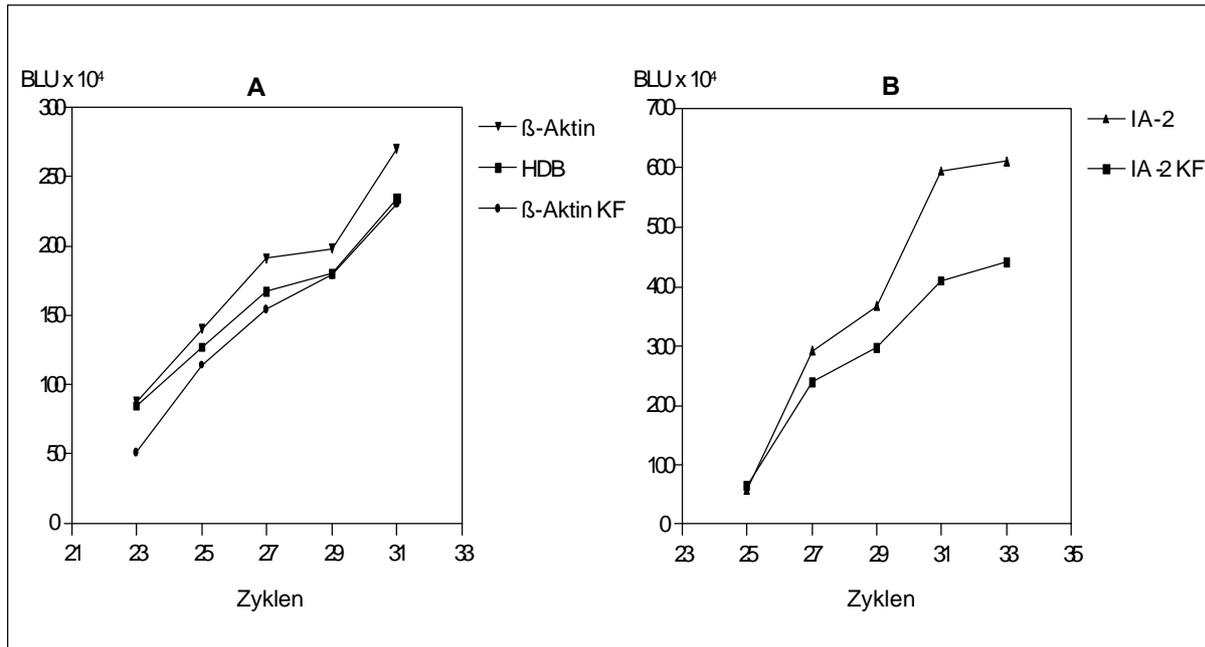
Für die  $\beta$ -Aktin PCR wurde die Plateauphase bei mehr 31 Zyklen noch nicht erreicht. Da aber die  $\beta$ -Aktin PCR bereits bei 27 Zyklen optimale Amplifikationsraten ergab, wurde darauf verzichtet, die tatsächliche Plateauphase zu ermitteln.

Abbildung 3.5: PCR zur Ermittlung der Plateauphase



**M = Marker, Spur 1 - 5 in A:  $\beta$ -Aktin PCR mit 23, 25, 27, 29 und 31 Zyklen, Spur 1 - 5 in B: IA-2 PCR mit 25, 27, 29, 31 und 33 Zyklen. Das  $\beta$ -Aktin Gen ist nach einer Amplifikation von 23 Zyklen bereits in hohen Konzentrationen nachzuweisen und lässt sich nach 29 Zyklen immer noch exponentiell amplifizieren. Das IA-2 Gen lässt sich nach 25 Zyklen nur schwach detektieren und erreicht nach 31 PCR-Zyklen eine Sättigung.**

Abbildung 3.6: Schematische Darstellung zur Plateauphasenermittlung



**A:  $\beta$ -Aktin und B: IA-2.** Die x-Achse gibt die Amplifikationszyklen an. Auf der y-Achse aufgetragen sind die densitometrischen Bestimmung der Bandenintensität dargestellt in Boehringer Light Units (BLU) gemessen mit einem Lumi Imager.

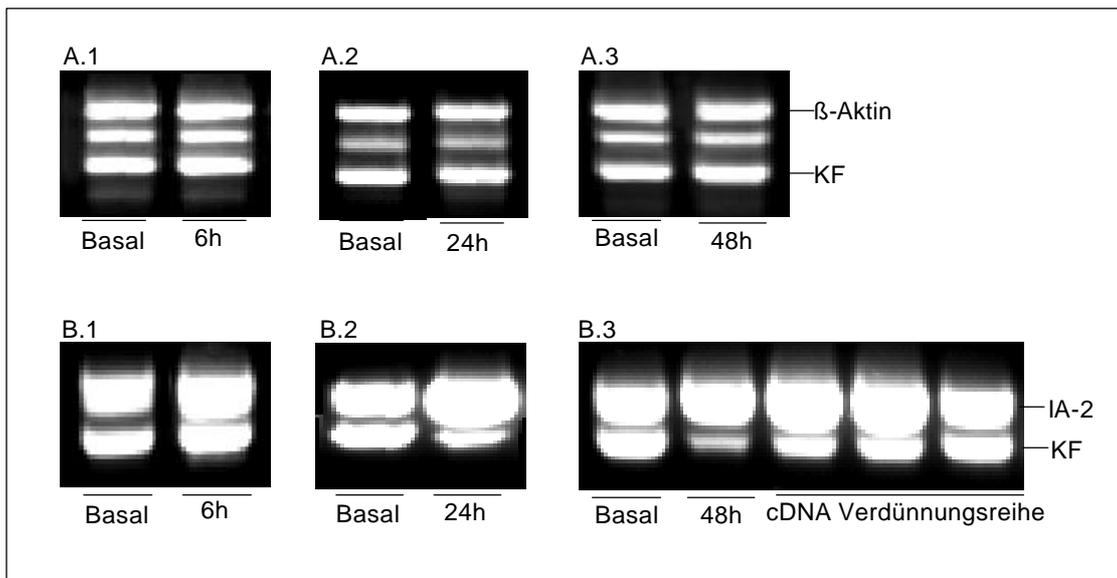
## 3.2 Regulation der IA-2 mRNA Expression

### 3.2.1 Untersuchung der an der IA-2 mRNA Expression beteiligten Signaltransduktionswege

Um den Einfluss von cAMP und PKC auf die IA-2 mRNA Expression zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen für 3 Tage mit basalem Komplettmedium (Kapitel 2.2.8.1) kultiviert und dann mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin, 100  $\mu\text{mol/l}$  IBMX oder 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA stimuliert.

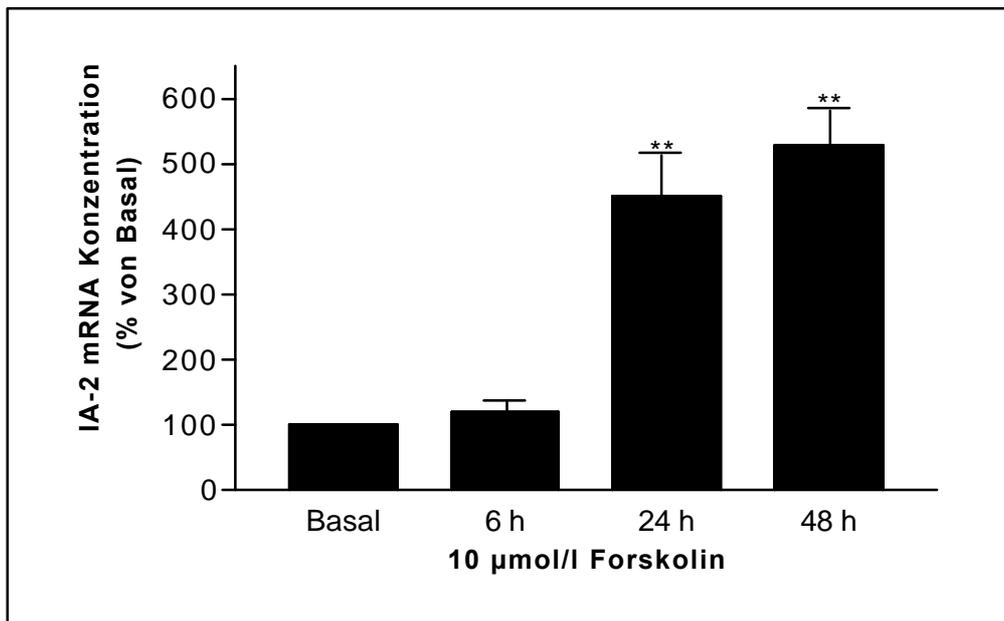
Zunächst wurde die Zeitabhängigkeit der Stimulation mit Forskolin überprüft. Nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin konnte nach 6 Stunden keine Steigerung der IA-2 mRNA Expression beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden fand sich ein signifikanter Anstieg der IA-2 mRNA Expression ( $451 \pm 85\%$ ,  $p < 0,001$ ). Um die Expressionsveränderungen über 48 Stunden zu analysieren, wurde nach einer 24-stündigen Inkubationsphase der Zellüberstand verworfen und die Zellen mit 3 ml frischem basalem Medium und 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin für weitere 24 Stunden stimuliert. Die Stimulierung der Zellen über 48 Stunden zeigte keine weiteren wesentlichen Verstärkung der IA-2 mRNA Expression im Vergleich zu der 24-stündigen Stimulation ( $528 \pm 67\%$ ).

Abbildung 3.7: Zeitabhängige Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch Forskolin



**A:** Einstellung der Proben auf den gleichen  $\beta$ -Aktin Gehalt. **B:** Zeitabhängige Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin. **B. 3:** Nach Verdünnung der cDNA Probe bei gleicher Konzentration der Kontrollfragmente kann die genaue Konzentration des IA-2 mRNA Gehalts ermittelt werden. Nach 6 Stunden Inkubation konnte keine Steigerung der IA-2 mRNA Expression beobachtet werden (B.1; Faktor 1,03). Nach 24 Stunden war der Stimulationseffekt 4,93-fach (B.2). Die Stimulierung der INS-1 Zellen über 48 Stunden ergab eine Steigerung der IA-2 mRNA Expression um den Faktor 5,4 (B.3).

Abbildung 3.8: Quantifizierung der zeitabhängigen Stimulierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Forskolin

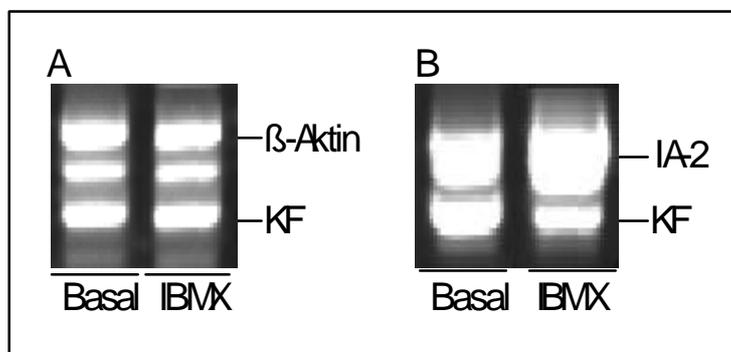


Stimulierung der IA-2 mRNA Expression bei INS-1 Zellen mit 10 µmol/l Forskolin über 6, 24 und 48 Stunden. Hochsignifikante Stimulierung der IA-2 mRNA Expression nach 24 und 48 Stunden Stimulation mit 10 µmol/l Forskolin.

(Anzahl der Versuche: n = 3); \*\* p < 0,001 vs Basal

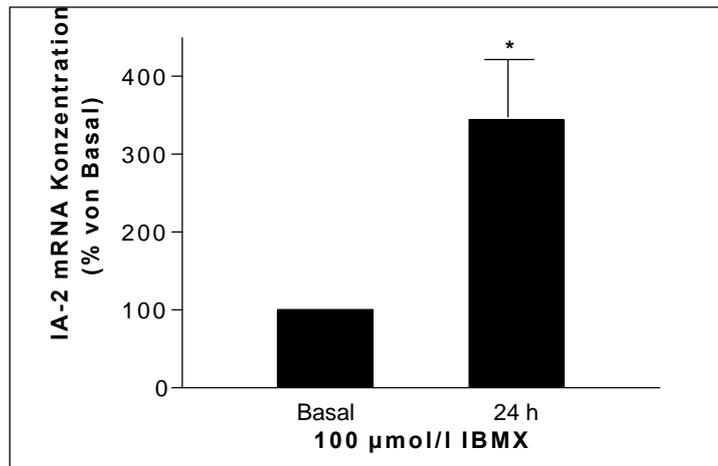
Um diesen Wirkmechanismus der IA-2 mRNA Expression über den second Messenger cAMP weiter zu verfolgen, wurden INS-1 Zellen über 24 Stunden mit 100 µmol/l IBMX stimuliert. Auch das IBMX führte zu einer hochsignifikanten Steigerung der IA-2 mRNA Expression ( $338 \pm 86\%$ , p < 0,01).

Abbildung 3.9: Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch IBMX



A: Justierung der Proben auf den gleichen cDNA Gehalt mit β-Aktin. B: IA-2 mRNA Expression Analyse. Nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit 100 µmol/l IBMX über 24 Stunden konnte eine Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression um das 3,45-fache beobachtet werden.

Abbildung 3.10: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit IBMX

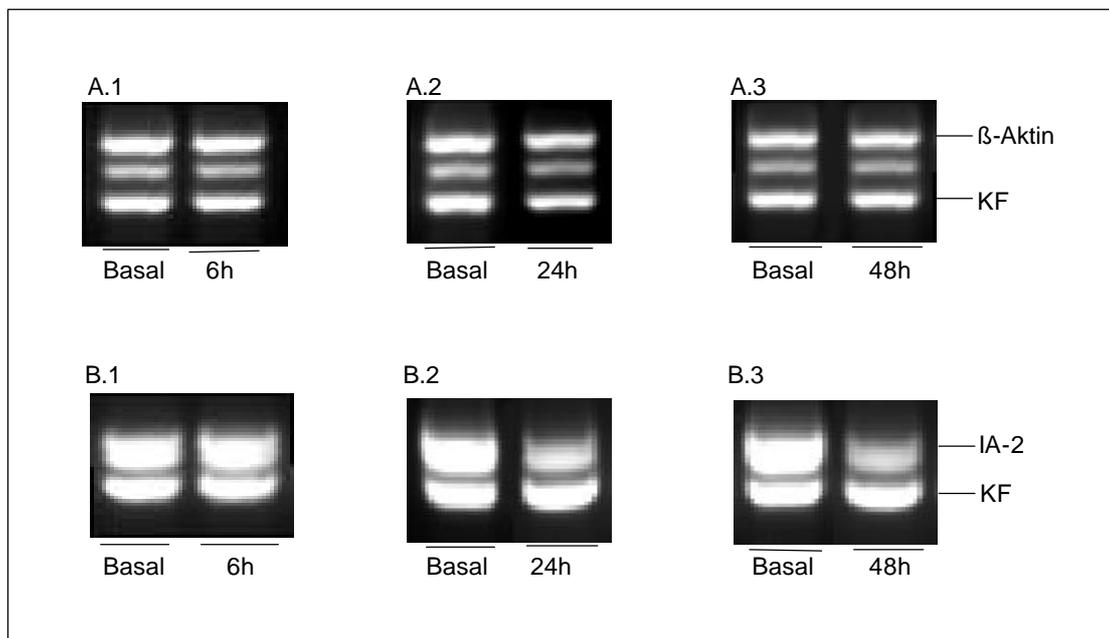


Stimulierung der IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen nach Inkubation mit 100 µmol/l IBMX über 24 Stunden.

(Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,01 vs Basal

Zur Überprüfung der PKC Effekte auf die IA-2 mRNA Expression wurden INS-1 Zellen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA über verschiedene Zeitperioden stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden konnten keine Veränderungen der IA-2 mRNA Expression beobachtet werden ( $80 \pm 23\%$ ). Nach Stimulierung der INS-1 Zellen über 24 und 48 Stunden kam es zu einer signifikanten Hemmung der IA-2 mRNA Expression ( $57 \pm 24\%$  und  $52 \pm 19\%$ ;  $p < 0,05$ ).

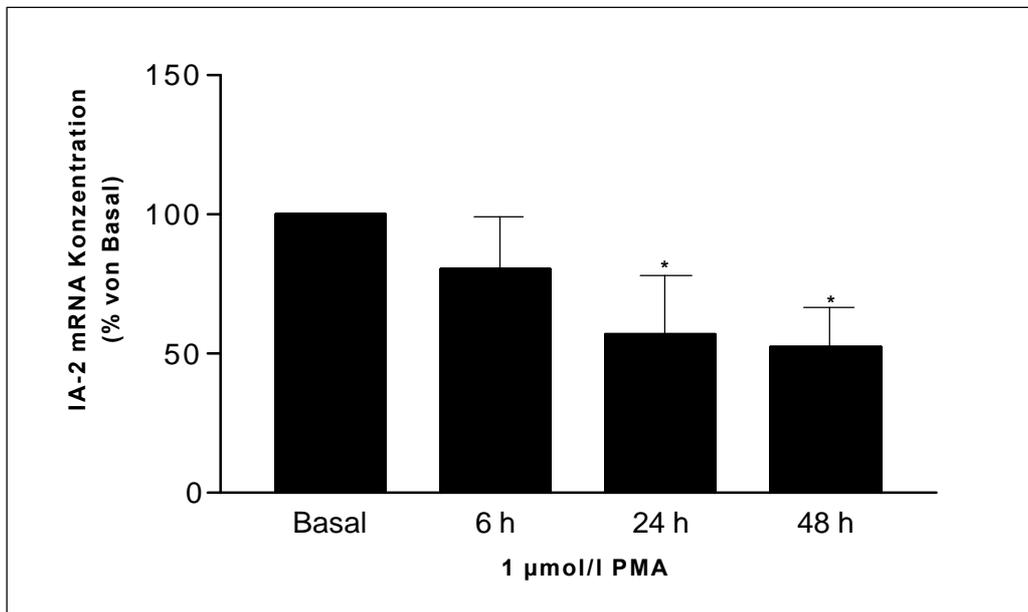
Abbildung 3.11: Zeitabhängige Hemmung der IA-2 mRNA Expression durch PMA



**A: Justierung der Proben mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. B: IA-2 mRNA Expression Analyse.**

**Nach 6 Stunden Inkubation konnte keine Hemmung der Expression beobachtet werden (Faktor 0,96; B.1). Die Inkubation über 24 bzw. 48 Stunden führte zu einer Hemmung der IA-2 mRNA Expression um den Faktor 0,59 (B.2) bzw. 0,51 (B.3).**

Abbildung 3.12: Quantifizierung der zeitabhängigen Hemmung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit PMA



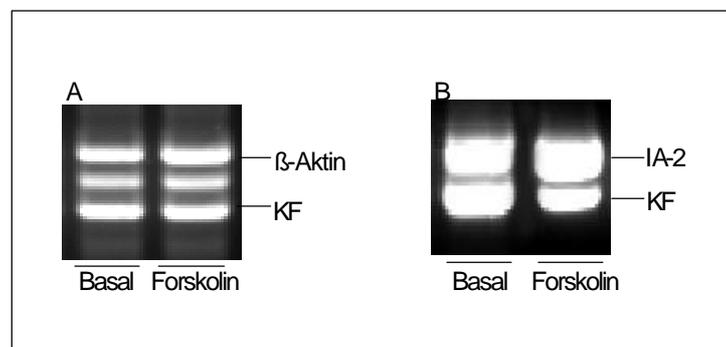
Die Behandlung der INS-1 Zellen mit 1 µmol/l PMA über 6, 24 und 48 Stunden führte zur Hemmung der IA-2 mRNA Expression nach einer 24-stündigen Inkubation. (Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,05 vs Basal

### 3.2.2 Regulation der IA-2 mRNA Expression in Ratten Inseln

Um zu überprüfen, ob sich die Effekte, die sich bei INS-1 Zellen zeigen, auch bei primär isolierten Inseln nachweisen lassen, wurden Ratten Inseln mit dem stärksten Stimulator, nämlich dem Forskolin, behandelt. Nach Isolierung der Inseln aus dem Pankreas wurden sie für 24 Stunden im basalem Komplettmedium mit 7 mM Glukose kultiviert und dann mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin für 24 Stunden stimuliert.

Das Forskolin führte nicht nur bei den INS-1 Zellen zu einer Hochregulierung der IA-2 Expression, sondern stimulierte auch bei den frisch isolierten Inseln die IA-2 mRNA Genexpression ( $268 \pm 46\%$ ,  $p < 0,05$ ).

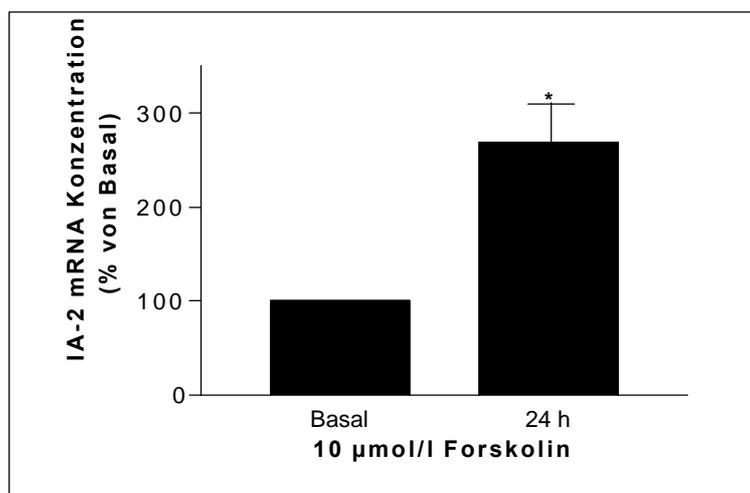
Abbildung 3.13: IA-2 mRNA Expression durch Forskolin in Ratten Inseln



**A:** Justierung der Probe mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** Analyse der IA-2 mRNA Genexpression.

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Inseln mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin konnte eine Steigerung der IA-2 mRNA Expression um den Faktor 2,45 beobachtet werden.

Abbildung 3.14: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Forskolin in Ratten Inseln



Stimulierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin über 24 Stunden in Ratten Inseln. (Anzahl der Versuche:  $n = 3$ ); \*  $p < 0,05$  vs Basal

### 3.2.3 Vergleich der quantitativen kompetitiven RT-PCR mit dem Northern Blot

Eine bewährte konventionelle Methode zur Nachweis spezifischer mRNAs ist der Northern Blot. Um die Spezifität der kompetitiven RT-PCR zu prüfen, wurden die Ergebnisse mit dem Northern Blot verglichen.

Die INS-1 Zellen wurden mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin oder 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA über 24 Stunden stimuliert und die IA-2 mRNA Expression mittels Northern Blot und kompetitive RT-PCR detektiert. Die Stimulierung der INS-1 Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin über 24 Stunden führte zur Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression ( $451 \pm 85\%$ , quantitative kompetitive RT-PCR bzw.  $501 \pm 79\%$ , Northern Blot Analyse). Nach Behandlung der INS-1 Zellen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA über 24 Stunden konnte eine Hemmung der IA-2 mRNA Expression beobachtet ( $57 \pm 24\%$ , quantitative kompetitive RT-PCR bzw.  $62 \pm 19\%$ , Northern Blot Analyse) werden.

Abbildung 3.15: Quantitative RT-PCR

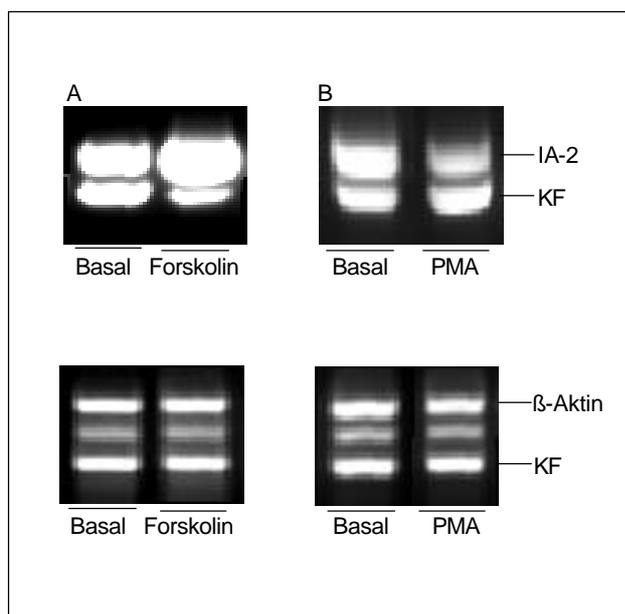
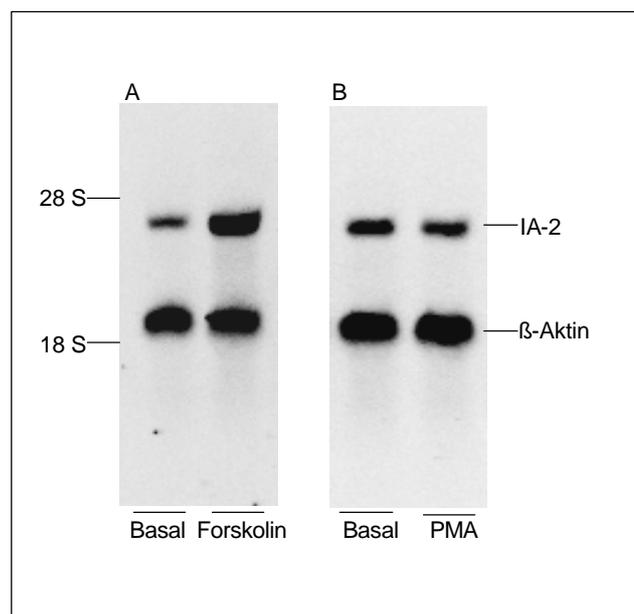
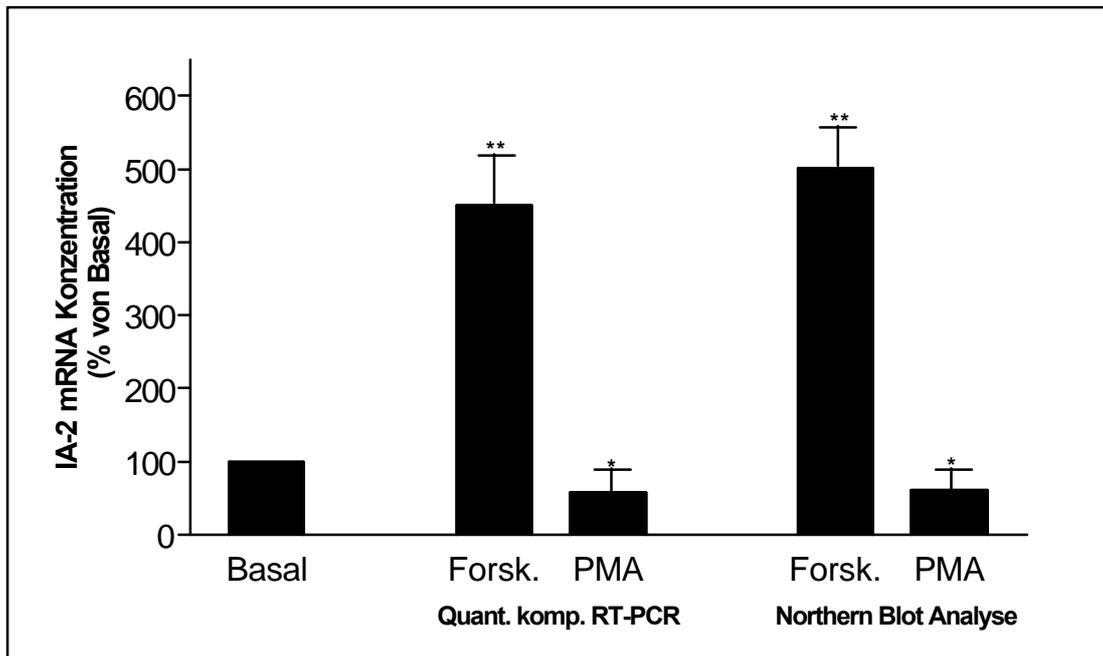


Abbildung 3.16: Northern Blot Analyse



**A:** Stimulierung mit Forskolin. **B:** Stimulierung mit PMA. Die Stimulierung der INS-1 Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin über 24 Stunden führte zu einer Hochregulierung der IA-2 Expression durch kompetitive RT-PCR um den Faktor 4,9 (Abb. 3.15, A) bzw. durch Northern Blot Analyse um den Faktor 5,18 (Abb. 3.16, A). Die Kultivierung der Zellen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA über 24 Stunden ergab eine Hemmung der IA-2 mRNA Expression durch kompetitive RT-PCR um den Faktor 0,59 (Abb. 3.15, B) bzw. durch Northern Blot Analyse um den Faktor 0,7 (Abb. 3.15, B).

Abbildung 3.17: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR und Northern Blot Analyse



Vergleich der IA-2 mRNA Expressionsanalyse mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR und Northern Blot Analyse nach Stimulierung der INS-1 Zelllinie mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin und 1  $\mu\text{mol/l}$  PMA über 24 Stunden.

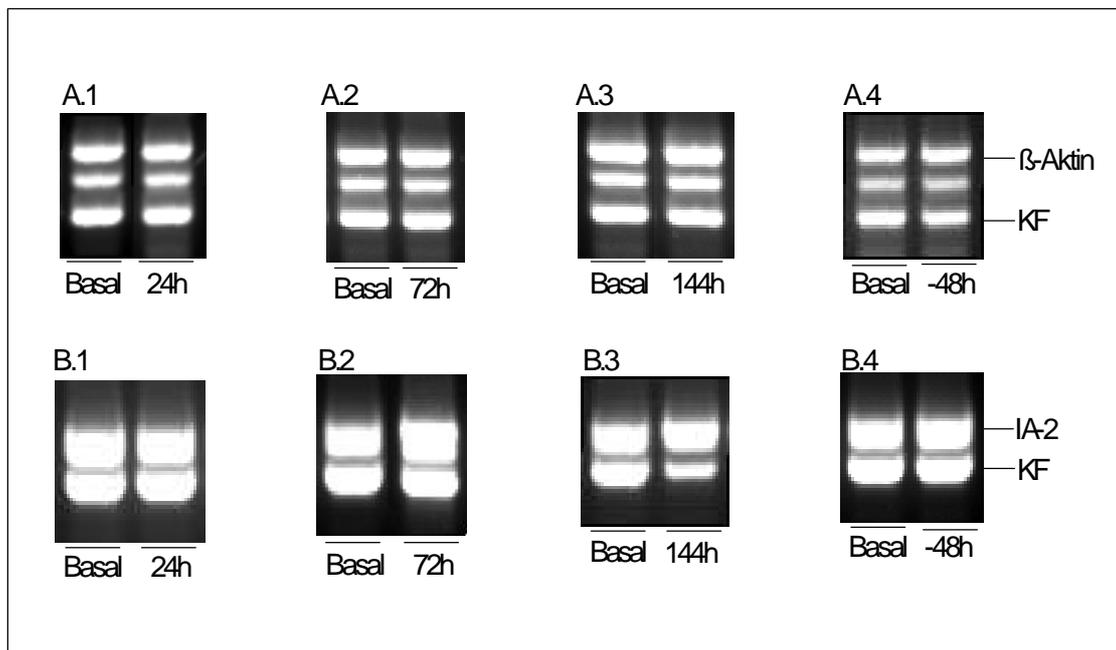
(Anzahl der Versuche:  $n = 3$ ); \*  $p < 0,05$  (PMA) bzw. \*\*  $p < 0,001$  (Forskolin) vs Basal

### 3.2.4 Regulation der IA-2 mRNA Expression durch Glukose

Der erhöhte Blutglukosespiegel stellt in vivo den zentralen Reiz für die Insulinsekretion in der Betazelle dar. Um den Einfluss von Glukose auf die IA-2 mRNA Expression und Insulinsekretion zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen über 24 - 144 Stunden stimuliert.

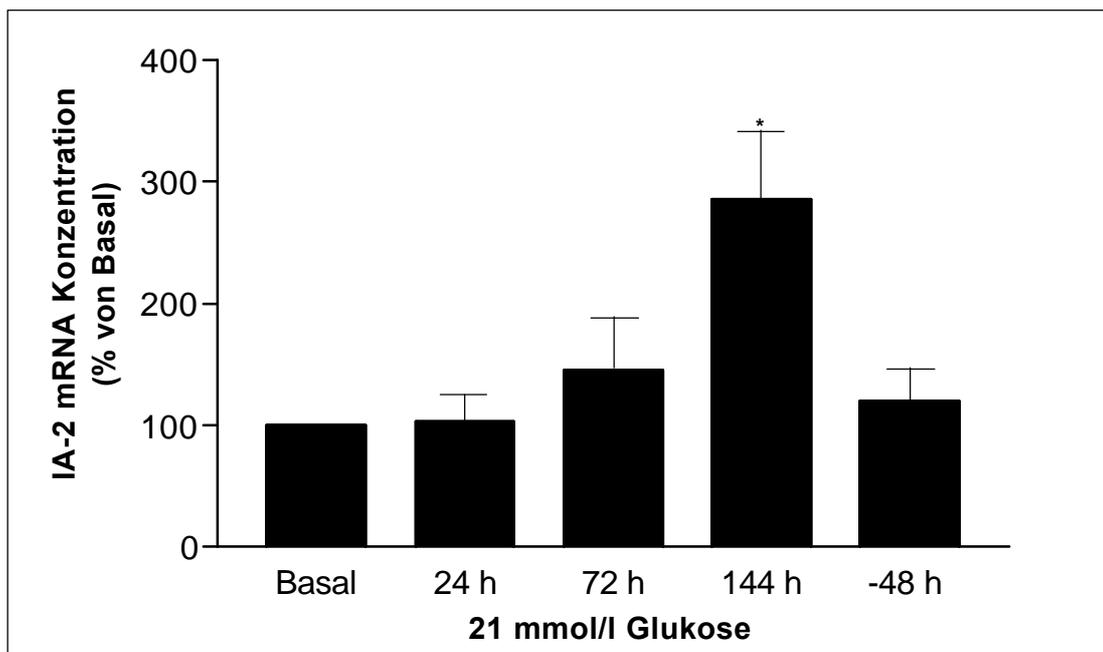
Die Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch Glukose weist sowohl eine Zeit- als auch Konzentrationsabhängigkeit auf. Nach einer Kurzzeitinkubation der Zellen über 24 Stunden mit 21 mmol/l Glukose lassen sich keine Veränderungen der Genexpression beobachten ( $103 \pm 18\%$ ), während die Behandlung der Zellen über 72 Stunden zu einer diskreten Erhöhung der IA-2 mRNA Spiegel führte ( $145 \pm 47\%$ ). Der maximale Anstieg der IA-2 mRNA Expression konnte nach 144 Stunden erreicht werden ( $285 \pm 68\%$ ,  $p < 0,05$ ). Eine anschließende Inkubation der INS-1 Zellen für weitere 48 Stunden (Gesamtdauer von 192 Stunden) mit 7 mmol/l Glukose normalisiert wieder den IA-2 mRNA Spiegel ( $120 \pm 21\%$ ).

Abbildung 3.18: Zeitabhängige Stimulierung der IA-2 Expression durch Glukose



**A:** Justierung der Proben mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse. Nach einer 24-stündigen Stimulierung der INS-1 Zellen mit 21 mmol/l Glukose konnte keine Steigerung der Genexpression beobachtet werden. Die Stimulierung der Zellen über 72 Stunden führte zu einer diskreten Hochregulation der Genexpression um den Faktor 1,4 (B.2). Die maximale Stimulierung (3,13-fach) konnte nach der Langzeitinkubation von 144 Stunden beobachtet werden (B.3). Eine anschließende Inkubation für 48 h mit 7 mmol/l Glukose führte wieder zur Normalisierung des mRNA Spiegels (B.4; Faktor 1,1).

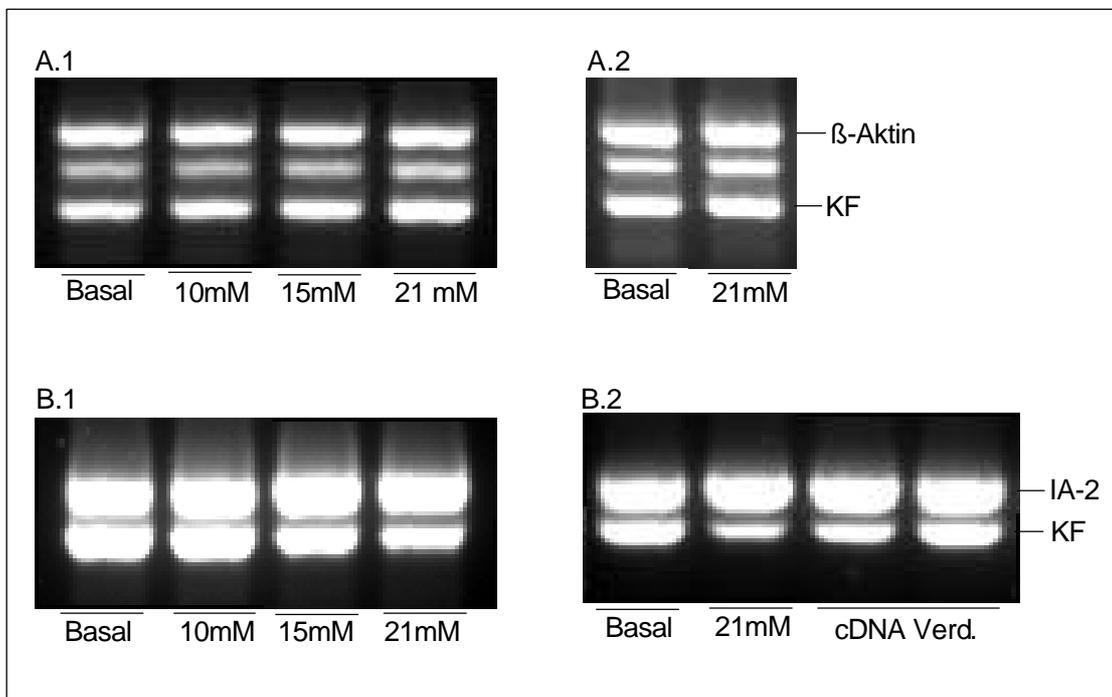
Abbildung 3.19: Quantifizierung der zeitabhängigen Stimulierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Glukose



Stimulierung der INS-1 Zellen mit 21 mmol/l Glukose über 24, 72 und 144 Stunden führte zur Hochregulation der IA-2 mRNA Expression. Eine anschließende Inkubation der INS-1 Zellen für weitere 48 Stunden mit 7 mmol/l Glukose normalisierte wieder den IA-2 mRNA Spiegel. (Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,05 vs Basal

Die Stimulierung der IA-2 mRNA Expression ist nicht nur zeit-, sondern auch konzentrationsabhängig. Die Stimulierung der INS-1 Zellen mit niedrigeren Glukosekonzentrationen (10 und 15 mmol/l) führte zu einer signifikanten Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression nach 6 Tagen. Nach Stimulierung der Zellen mit 10 mmol/l Glukose war eine geringe Erhöhung der Expression zu beobachten ( $114 \pm 21\%$ ). Eine signifikante Hochregulation der IA-2 mRNA Expression wurde nach Stimulierung mit 15 mmol/l Glukose registriert ( $172 \pm 26\%$ ,  $p < 0,05$ ). Die maximale Stimulierung konnte nach Behandlung der INS-1 Zellen mit 21 mmol/l Glukose während einer Langzeitinkubation über 6 Tage beobachtet werden.

Abbildung 3.20: Konzentrationsabhängige Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch Glukose

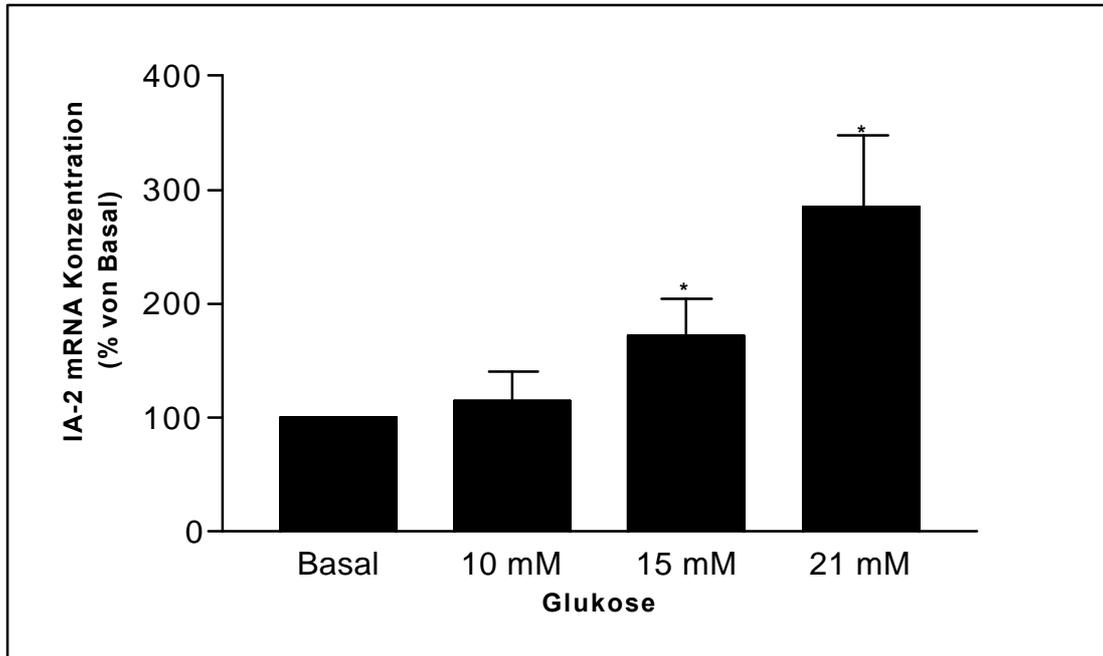


**A:** Justierung der Probe mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt.

**B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse. B.2: Nach Verdünnung der cDNA Probe bei gleicher Konzentration der Kontrollfragmente kann die genaue Konzentration des IA-2 mRNA Gehalts ermittelt werden.

Nach Stimulierung der INS-1 Zellen über 6 Tage mit 10 mmol/l Glukose konnte keine Steigerung der IA-2 mRNA Expression beobachtet werden (1,14 fache). Die Behandlung der INS-1 Zellen mit 15 mmol/l Glukose führte zu einer 2,13 fachen Erhöhung der Genexpression. Die maximale Stimulierung der IA-2 mRNA Expression um den Faktor 2,8 konnte nach Kultivierung mit 21 mmol/l Glukose festgestellt werden.

Abbildung 3.21: Quantifizierung der konzentrationsabhängigen Stimulierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Glukose

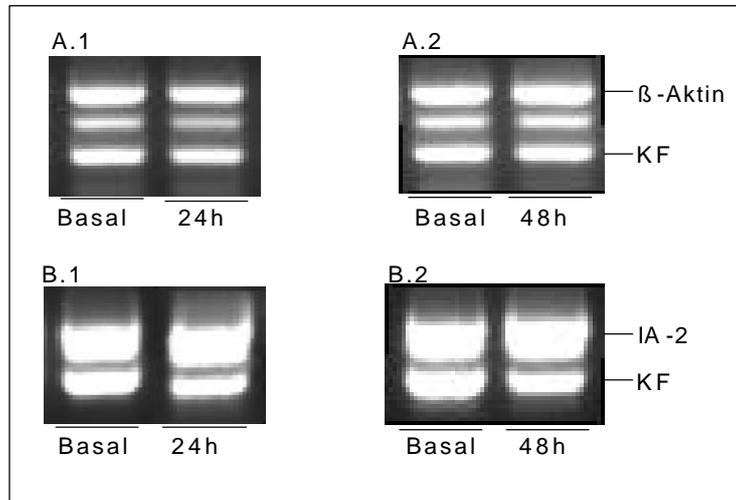


Stimulierung der INS-1 Zellen mit 10, 15 und 21 mmol/l Glukose über 6 Tage stimuliert die IA-2 mRNA Expression.  
(Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,05 vs Basal

### 3.2.5 Einfluss von endokrinen Faktoren auf den IA-2 mRNA Spiegel

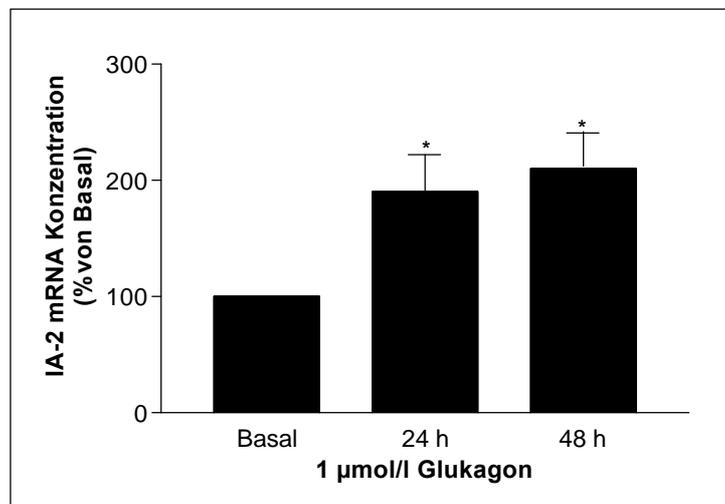
Um den Einfluss von Hormonen auf die IA-2 mRNA Expression zu analysieren, wurden INS-1 Zellen über 24 bis 48 Stunden mit Glukagon und Somatostatin stimuliert. Die Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Glukagon über 24 und 48 Stunden führte zur Stimulierung der IA-2 mRNA Expression (24 Stunden:  $190 \pm 35\%$ ,  $p < 0,05$ ; 48 Stunden:  $210 \pm 38\%$ ,  $p < 0,05$ ). Die Behandlung der Zellen über 48 Stunden mit 1  $\mu\text{mol/l}$  als auch mit 10  $\mu\text{mol/l}$  zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der Stimulierung mit 1  $\mu\text{mol/l}$  über 24 Stunden.

Abbildung 3.22: Stimulierung der IA-2 mRNA Expression durch Glukagon



**A:** Justierung der Proben mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse. Die Behandlung der INS-1 Zellen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Glukagon über 24 Stunden führte zur Steigerung der mRNA Expression um den Faktor 1,86 (B.1). Eine Kultivierung der Zellen über 48 Stunden führte zur Stimulation der IA-2 mRNA Expression um den Faktor 1,96 (B.2).

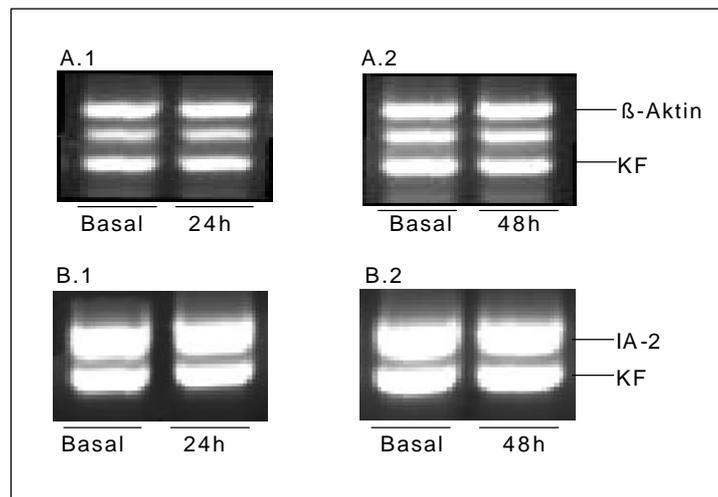
Abbildung 3.23: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Glukagon



Stimulierung von INS-1 Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Glukagon über 24 und 48 Stunden führte zur Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression. (Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,05 vs Basal

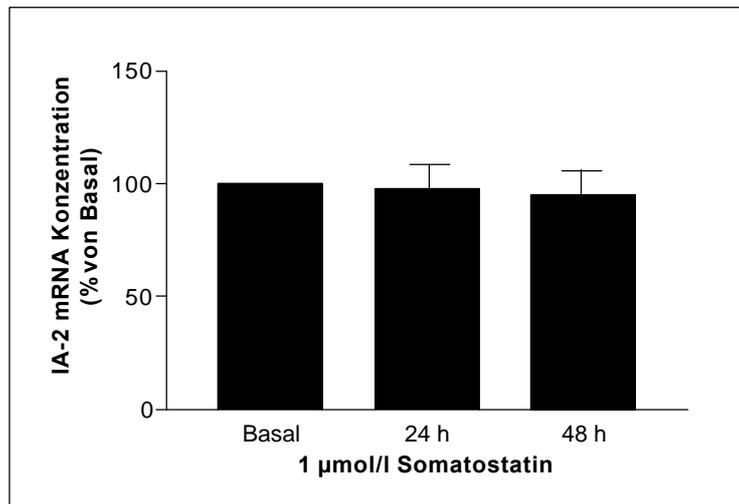
Im Gegensatz zu Glukagon lässt sich nach Behandlung der Zellen mit 1 oder 10  $\mu\text{mol/l}$  Somatostatin sowohl über 24 Stunden ( $98 \pm 13\%$ ) als auch über 48 Stunden ( $95 \pm 10\%$ ) kein Unterschied zu den unstimulierten INS-1 Zellen feststellen.

Abbildung 3.24: IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Somatostatin



**A:** Justierung der Proben mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse. Eine Inkubation der Zellen über 24 und 48 Stunden ergab keine Änderung der IA-2 mRNA Spiegel (B.1: 1,02) bzw. (B.2: 0,99).

Abbildung 3.25: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression durch Somatostatin

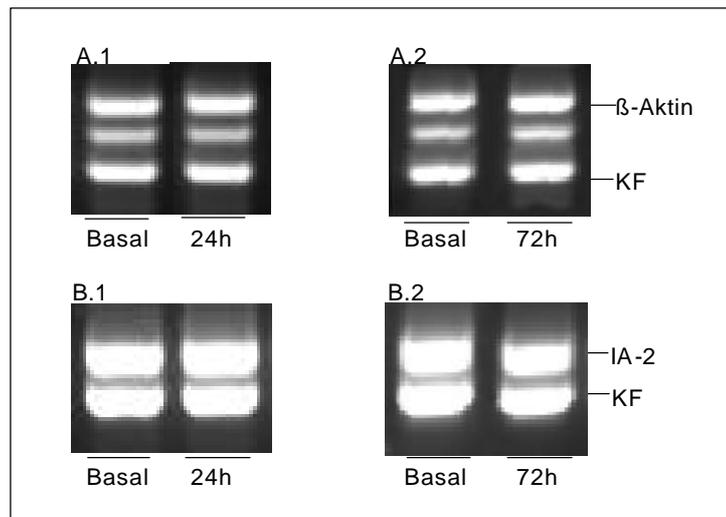


Die Stimulierung der INS-1 Zellen über 24 Stunden als auch über 48 Stunden führte zu keiner Änderung der IA-2 mRNA Spiegel im Vergleich zu basal unstimulierten Zellen. (Anzahl der Versuche: n = 3)

### 3.2.6 Einfluss von Glibenclamid und Diazoxid auf die IA-2 mRNA Expression

Um den Einfluss von Antidiabetika auf die IA-2 mRNA Expression zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid (5  $\mu\text{g/ml}$ ) sowohl über 24 als auch über 72 Stunden stimuliert. Das Glibenclamid führte nach 24 Stunden ( $96 \pm 18\%$ ) als auch nach 72 Stunden ( $105 \pm 22\%$ ) Inkubation zu keinen Veränderungen der IA-2 Genexpression.

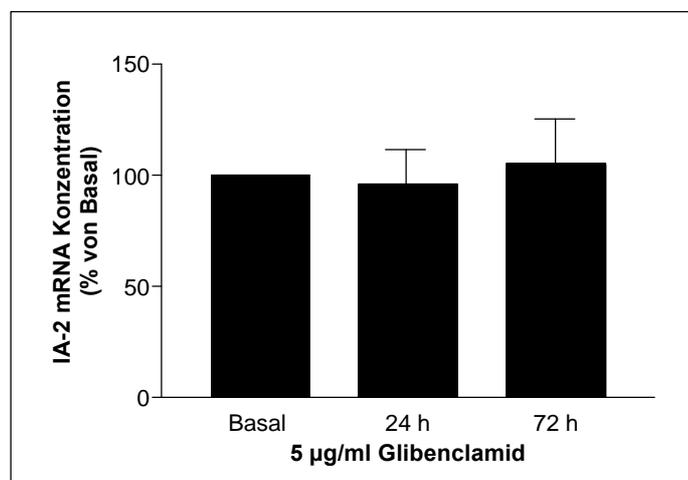
Abbildung 3.26: Einfluss von Glibenclamid auf die IA-2 mRNA Konzentration



**A:** Justierung der Proben mit  $\beta$ -Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse.

Nach Behandlung der INS-1 Zellen mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Glibenclamid über 24 Stunden liegt der IA-2 mRNA Spiegel bei dem Faktor 1,04 und nach 72 Stunden 0,93 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen.

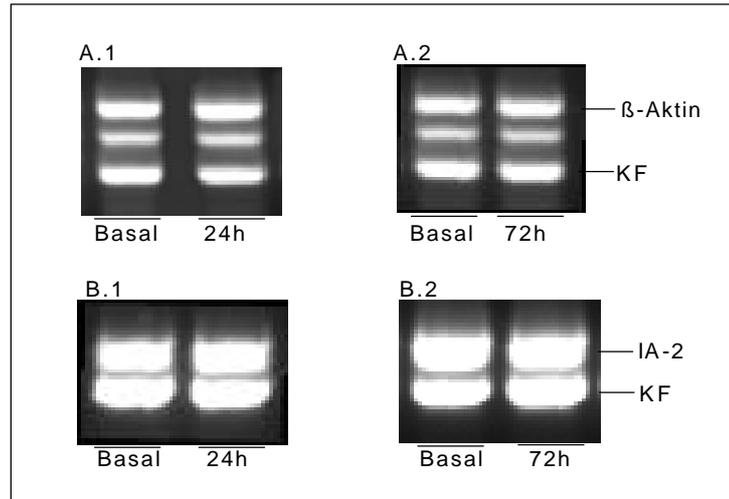
Abbildung 3.27: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Glibenclamid



Stimulation der INS-1 Zellen mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Glibenclamid über 24 und 72 Stunden. (Anzahl der Versuche: n = 3)

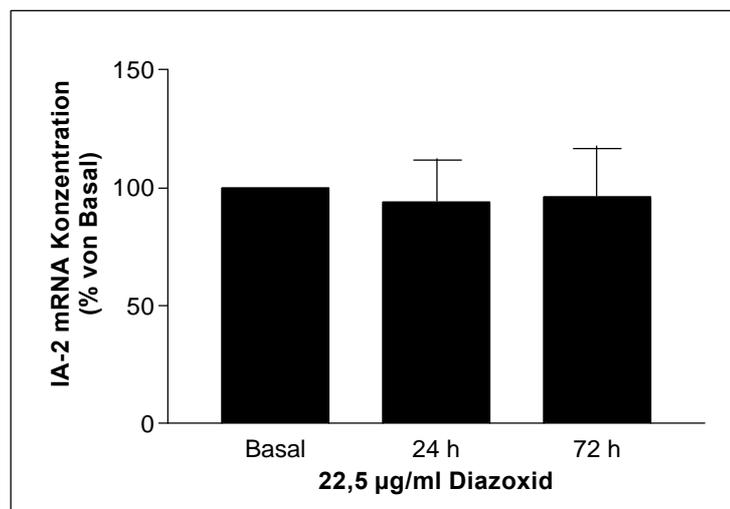
Ebenfalls wurde der Effekt von Diazoxid ausgetestet. Auch hier konnte nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit 22,5 µg/ml über 24 Stunden ( $94 \pm 20\%$ ) als auch 72 Stunden ( $96 \pm 23\%$ ) kein Unterschied in der IA-2 mRNA Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen beobachtet werden. Auch die Kostimulation von Diazoxid mit 15 mmol/l Glukose über 24 Stunden führte nicht zu einer Änderung der IA-2 mRNA Expression.

Abbildung 3.28: Einfluss von Diazoxid auf den IA-2 mRNA Spiegel



**A:** Justierung der Proben mit β-Aktin auf den gleichen cDNA Gehalt. **B:** IA-2 mRNA Genexpression Analyse. Die Behandlung der INS-1 Zellen mit 22,5 µg/ml Diazoxid über 24 Stunden führte zu einem mRNA Spiegel von 1,04 (B.1) und eine Inkubation über 72 Stunden zu einem Spiegel von 1,03 (B.2) gegenüber den unstimulierten Zellen.

Abbildung 3.29: Quantifizierung der IA-2 mRNA Expression nach Behandlung mit Diazoxid



Stimulierung der INS-1 Zellen mit 22,5 µg/ml über 24 Stunden als auch 72 Stunden ergaben keinen Unterschied der IA-2 mRNA Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. (Anzahl der Versuche: n = 3)

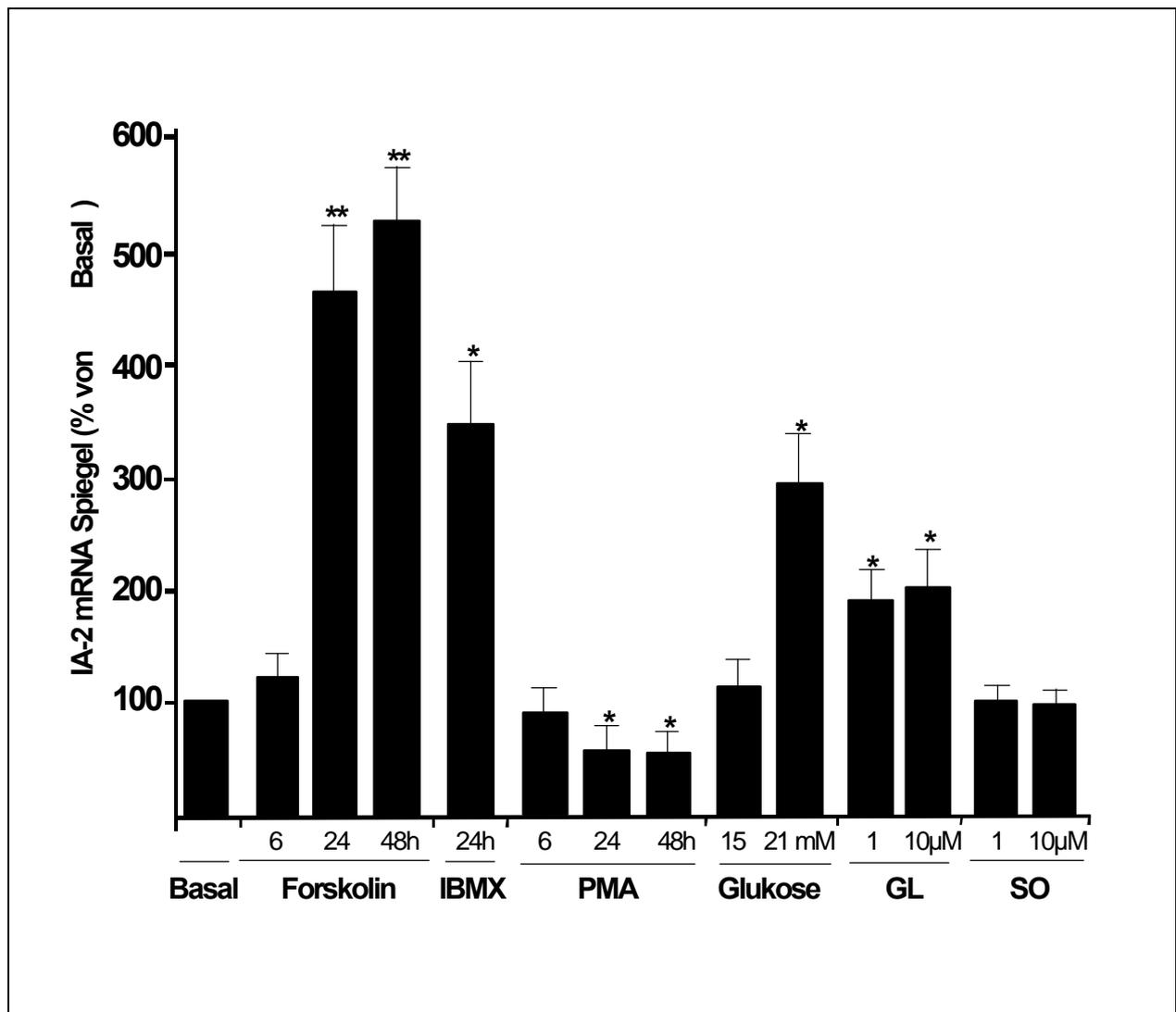
### 3.3 Vergleich der Stimulation der IA-2 mRNA Expression mit der Insulinsekretion

Abbildung 3.30 zeigt den Vergleich der verschiedenen Stimulationen auf die IA-2 Genexpression.

Die höchste Stimulierung der IA-2 mRNA Expression war nach Behandlung der INS-1 Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Forskolin und 100  $\mu\text{mol/l}$  IBMX zu beobachten.

PMA führte zu einer Hemmung der IA-2 mRNA Expression.

Abbildung 3.30: Regulation der IA-2 mRNA Expression

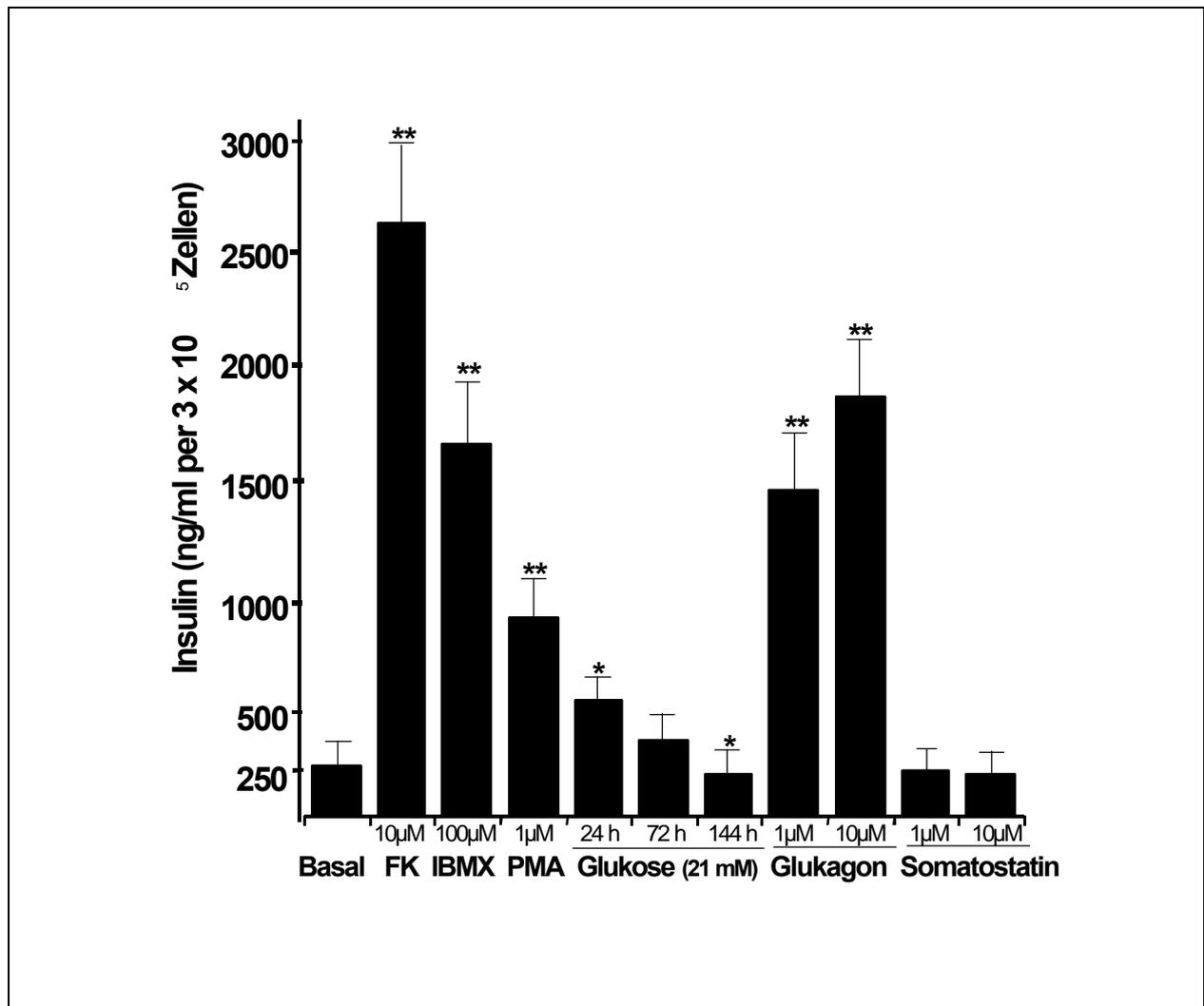


Zusammenfassung der wichtigsten Effekte auf die Regulation der IA-2 mRNA Expression. Aufgetragen auf der x-Achse die verschiedenen Versuchsreihen mit Forskolin (10  $\mu\text{mol/l}$ , 6 - 48 h), IBMX (100  $\mu\text{mol/l}$ , 24 h), PMA (1  $\mu\text{mol/l}$ , 6 - 48 h), Glukose (10 und 21 mmol/l, 144 h), Glukagon (GL)(1 und 10  $\mu\text{mol/l}$ , 24 h) und Somatostatin (SO)(1 und 10  $\mu\text{mol/l}$ , 24 h) und auf der y-Achse den IA-2 mRNA Gehalt in % im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. (Anzahl der Versuche: n = 3); \* p < 0,05 bzw. \*\* p < 0,001 vs Basal

Um parallel zur mRNA Analyse die Insulinsekretion der INS-1 Zellen zu überprüfen, wurde vor der RNA Isolierung unmittelbar nach der Stimulationsphase der Zellmediumüberstand entnommen und bei  $-80^{\circ}$  bis zur Durchführung der Insulinmessung eingefroren.

Die Bestimmung der Insulinakkumulation erfolgte mit einem von Linco Research angebotenen Rat Insulin RIA (Radioimmunoassay) Kit (Abschnitt 2.2.3). Die Bestimmung der Insulinkonzentration erlaubt ein Rückschluss über die Korrelation zwischen der Insulinsekretion und der IA-2 mRNA Expression.

Abbildung 3.31: Insulinsekretion bei INS-1 Zellen



Auf der x-Achse aufgetragen sind die verschiedenen Versuchsreihen mit Forskolin (10  $\mu$ mol/l, 24 h), IBMX (100  $\mu$ mol/l, 24 h), PMA (1  $\mu$ mol/l, 24 h), Glukose (21 mmol/l, 24 – 144 h), Glukagon (1 und 10  $\mu$ mol/l, 24 h) und auf der y-Achse die Insulinakkumulation bei  $3 \times 10^5$  INS-1 Zellen pro ml Medium.

(Anzahl der Versuche = 3); \*\*  $p < 0,001$  bzw. \*  $p < 0,05$  vs Basal

Die basalen Werte der Insulinsekretion im Zellüberstand bei  $3 \times 10^5$ /ml Zellen lagen bei  $260 \pm 50$  ng Insulin pro ml Medium. Hochsignifikante Veränderungen der Insulinsekretion konnten nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit  $10 \mu\text{mol/l}$  Forskolin über 24 Stunden ( $2556 \pm 539$  ng/ml),  $100 \mu\text{mol/l}$  IBMX über 24 Stunden ( $1596 \pm 419$  ng/ml),  $1 \mu\text{mol/l}$  PMA über 24 Stunden ( $853 \pm 170$  ng/ml) und sowohl  $1 \mu\text{mol/l}$  Glukagon ( $1445 \pm 470$  ng/ml) als auch  $10 \mu\text{mol/l}$  Glukagon ( $1880 \pm 510$  ng/ml) über 24 Stunden beobachtet werden.

Im Gegensatz zu der Behandlung mit  $21 \text{ mmol/l}$  Glukose über 24 Stunden ( $502 \pm 48$  ng/ml), die zu einer deutlichen Hochregulation der Insulinsekretion führte, lässt sich eine signifikante Hemmung der Insulinsekretion nach einer Langzeitinkubation der INS-1 Zellen mit  $21 \text{ mmol/l}$  Glukose über 144 Stunden ( $132 \pm 56$  ng/ml) beobachten ( $p < 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt erlangte die IA-2 mRNA Expression ihre höchsten Werte.

Nicht signifikante Veränderungen der Insulinsekretion konnten nach Behandlung der INS-1 Zellen mit  $21 \text{ mmol/l}$  Glukose über 72 Stunden ( $327 \pm 73$  ng/ml), und  $1 \mu\text{mol/l}$  Somatostatin ( $226 \pm 48$  ng/ml) als auch mit  $10 \mu\text{mol/l}$  Somatostatin ( $201 \pm 34$  ng/ml) über 24 Stunden beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Die Tyrosinphosphatase IA-2 gehört neben Insulin und dem Enzym GAD zu den wichtigsten Autoantigenen beim Typ 1 Diabetes (Wasmeier et al., 1996, Lan et al., 1994, Lu et al., 1996). IA-2 wird in Neuronen des Zentralnervensystem, in der Hypophyse, in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes und in den Betazellen der Langerhans'schen Inseln exprimiert (Lan et al., 1994). Während die humorale und zelluläre Immunreaktion in zahlreichen Studien bereits gut untersucht wurde ist (Schranz, 1998), ist über die biologische Funktion des Antigens nur wenig bekannt. Daher war es das Ziel der Studie, Mechanismen der Regulation der IA-2 Genexpression in Betazellen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der cAMP und der PKC Signaltransduktionsweg die mRNA Expression von IA-2 steuert. Glukagon, welches zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels führt, wurde als physiologischer Stimulator der IA-2 Expression identifiziert. Darüber hinaus wurde ein signifikanter zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt von Glukose nachgewiesen.

Da IA-2 nur in geringer Konzentration in den Langerhans'schen Inseln und in Insulinomazellen exprimiert ist (Christie et al., 1990), war es zunächst notwendig, eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung der IA-2 mRNA Spiegel zu etablieren. Gewählt wurde die kompetitive RT-PCR, bei der die Amplifizierung der cDNA Proben mit einem Kompetitorfragment bekannter Konzentration konkurriert, so dass die Ergebnisse quantifiziert werden konnten. Die kompetitive RT-PCR ist eine sehr sensitive Methode, die bisher unter anderem zum Nachweis von Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) mRNA in humanen Thyreozyten und für Onkogenexpressionsanalysen verwendet worden ist (Aust et al., 1997; Scheuermann und Bauer, 1993). Bei optimierten PCR Bedingungen lag die Nachweisgrenze für IA-2 bei  $10^{-7}$  fmol/ $\mu$ l (29 Zyklen) und  $\beta$ -Aktin bei  $10^{-6}$  fmol/ $\mu$ l (27 Zyklen). Mit dieser Technik war erstmals eine Methode verfügbar, kleine Änderungen der IA-2 mRNA Spiegel zu erfassen. Im direkten Vergleich mit Northern Blot Analysen konnte die Spezifität und die hohe Sensitivität der kompetitiven RT-PCR zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin und IA-2 mRNA bestätigt werden.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden INS-1 Zellen ausgewählt, da in diesen Zellen im Gegensatz zu vielen anderen Insulinomazellen die Glukosesensitivität partiell erhalten ist und IA-2 exprimiert wird (Wollheim et al., 1990). Die INS-1 Zellen sind daher ein häufig verwendetes Modell für Betazellen. Mit INS-1 Zellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung von metabolischen und hormonellen Faktoren sowie Studien zur Genexpression betazellspezifischer Proteine durchgeführt (Asfari et al., 1992; Brun et al., 1993; Susini et al., 1998).

Da IA-2 in den Betazellen in den Insulingranula lokalisiert ist, wurden die zwei second Messenger Systeme, cAMP/PKA und die PKC, untersucht, die eine zentrale Rolle in der Regulation der Glukose-induzierten Insulinsekretion spielen (Sharp et al., 1979; Prentki et al., 1987; Hii et al., 1987; Yaekura et al., 1996). Die Stimulierung der INS-1 Zellen mit dem synthetischen cAMP Agonisten Forskolin als auch mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX führten nach einer 24-stündigen Inkubationsphase zur signifikanten Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression. Da beide Substanzen zur Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels führen (Howell et al., 1994), konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Beteiligung von cAMP an der differentiellen Regulation von IA-2 nachgewiesen werden. Diese Befunde konnten mit primär isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte bestätigt werden. Der Stimulationseffekt war jedoch im Vergleich zu den INS-1 Zellen bei den Inseln auf die Hälfte reduziert. Dieses könnte aus der Anwesenheit von pankreatischen Alphazellen resultieren, welche Glukagon sezernieren und somit bereits im basalem Zustand die IA-2 mRNA Expression stimulieren. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurden INS-1 Zellen mit den Hormonen Glukagon und Somatostatin behandelt. Glukagon ist ein starker Stimulator der Insulinsekretion. Nach Bindung des Hormons an seinem Rezeptor wird die Adenylatzyklase aktiviert und es kommt zu einem Anstieg des cAMP Spiegels (Schuit und Pipeleers, 1986; Berggren et al., 1994; McDermott und Sharp, 1994). Rezeptoren für Glukagon konnten sowohl in INS-1 Zellen als auch in primären pankreatischen Betazellen nachweisen werden (Thorens, 1992; Van Schravendijk et al., 1985; Kawai et al., 1995; Kieffer et al., 1996). Die Stimulierung der INS-1 Zellen mit Glukagon führte wie Forskolin und IBMX nach einer 24-stündigen Inkubationsphase zur signifikanten Erhöhung der IA-2 mRNA Expression. Durch diesen Mechanismus können die Unterschiede zwischen den INS-1 Zellen und isolierten Inseln erklärt werden.

Darüber hinaus lassen diese Daten vermuten, dass Glukagon in vivo einen parakrinen Effekt auf die IA-2 Genexpression ausübt, der durch cAMP vermittelt wird.

Während Glukagon die Insulinsekretion von Betazellen fördert, inhibieren andere Hormone wie z.B. Somatostatin, Adrenalin und Galanin die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Holst, 1992). Der inhibitorische Effekt von Somatostatin beruht auf einer Erniedrigung des cAMP Spiegels verbunden mit einer Hyperpolarisation und Abnahme der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration (Berggren et al., 1992; Nilsson et al., 1989; Kakei et al., 1994; Zambre et al., 1999). Somatostatinrezeptoren (SSRT1-5) konnten in primären Betazellen und Hamster Insulinomazellen (HIT) nachgewiesen werden (Mehler et al., 1980, Zambre et al., 1999; Zhang et al., 1991; Redmon et al., 1994; Seaquist et al., 1995). In der hier vorliegenden Arbeit war sowohl nach einer 24- als auch 72-stündigen Stimulierung der INS-1 Zellen keine Veränderung der IA-2 Genexpression zu beobachten. Da im Kulturüberstand ebenfalls keine Hemmung der Insulinsekretion nachgewiesen werden konnte, könnte der fehlende Somatostatineffekt entweder auf eine Vorstimulation mit zu niedrigen Glukosekonzentrationen oder auf die fehlende Expression von Somatostatinrezeptoren bzw. einen mutierten Rezeptor in INS-1 Zellen zurückzuführen sein. Dies muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Zyklisches AMP fungiert als „second messenger“ zahlreicher Rezeptoren und ist in die Glukose-induzierte Ausschüttung des Insulins in Betazellen involviert. Ein hoher intrazellulärer cAMP Spiegel aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche ihrerseits die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen katalysiert. Durch Aktivierung der PKA wird unter anderem die  $Ca^{2+}$  Sensibilisierung (Hellman et al., 1992; Berggren et al., 1992 und 1994) und Genexpressionsveränderungen vermittelt (Prentki et al., 1987; Lester et al., 1997). Die cAMP abhängige Proteinphosphorylierung führt unter anderem zur Steigerung der Insulinsekretion durch Schließung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und Erhöhung des intrazellulären Kalziumeinstroms (Berggren et al., 1994). Das Endresultat ist eine erhöhte Insulinausschüttung, die auf einer beschleunigten Exozytose der Insulinsekretionsgranula beruht (Yu et al., 2000). Die von uns beobachtete erhöhte Insulinsekretion nach Forskolin-, IBMX- und Glukagonbehandlung ist somit ausreichend erklärt. Es bleibt noch zu diskutieren, wie die IA-2 Genexpression durch cAMP vermittelt wird.

Vor kurzem beschrieb Xie et al. (Xie et al., 1998) mehrere Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der Promotorregion des IA-2 Gens, unter anderem das cAMP response element (CRE), E2F, HSF, YY1 und Sp1. Eine Stimulierung der IA-2 Genexpression durch Phosphorylierung des „cAMP response element binding proteins“ (CREB) wäre denkbar. Die durch PKA vermittelte Proteinphosphorylierung führt zur Translokation von CREB in den Zellkern. Dort bindet CREB an CRE und kann auf diese Weise die Genexpression stimulieren (Comb et al., 1986; Hoeffler et al., 1988). Eine Alternativmöglichkeit ist eine cAMP-abhängige Stimulierung der Transkriptionsfaktoren durch CREM (CRE-Modulatoren). Transkriptionsfaktoren aus der CREB als auch aus der CREM-Familie wurden in Betazellen nachgewiesen und sind an der Regulation des Insulingens beteiligt (Foulkes und Sassone-Corsi, 1992, Delle et al., 1997; Tamai et al., 1997; Thorens et al., 1996). Für die genaue Aufklärung der an der IA-2 Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren müssen weitere Studien durchgeführt werden.

PKC stellt den zweiten wichtigen Signaltransduktionsweg in Betazellen dar. INS-1 Zellen wurden deshalb mit PMA sowohl über 6 als auch 24 Stunden stimuliert. Die Kurzinkubation mit Phorbol ester führt zur Aktivierung der PKC, während eine Langzeitinkubation von mehr als 18 Stunden diese inaktiviert (Hii et al., 1987; Arkhammar et al., 1989; Zawalich et al., 1991). Nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit Phorbol ester über 6 Stunden konnten keine Veränderungen in der IA-2 mRNA Expression beobachtet werden, während nach Inkubation über 24 Stunden eine signifikante Hemmung zu beobachten war. Wir konnten somit eindeutig nachweisen, dass die Hemmung/Inaktivierung der PKC die IA-2 mRNA Expression erniedrigt. Offen bleibt, ob eine Langzeitaktivierung der PKC die IA-2 mRNA Expression verändern würde. Interessant ist der Befund, dass, wie in anderen Studien beschrieben, nach 24 Stunden Inkubation von INS-1 Zellen mit PMA die Insulinsekretion gesteigert war (Wollheim und Regazzi, 1990; Persaud et al., 1992; Zawalich et al., 1997). Die Unterschiede zwischen der erhöhten Insulinsekretion und der inhibierten IA-2 Genexpression deuten darauf hin, dass die Regulation der IA-2 Expression in INS-1 Zellen nicht vollständig parallel mit der Insulinregulation gekoppelt ist. Im Hinblick auf die sehr komplexen Interaktionen der PKC im Zellmetabolismus der Betazellen und der multiplen Isoformen (Liu, 1996; Koya und King, 1998; Buchner, 2000), wurde im Rahmen dieser Promotion darauf verzichtet, den genauen molekularen Mechanismus der IA-2 Genexpressionshemmung zu klären.

Die Transkription des Insulingens und die Insulinsekretion wird in Betazellen durch zahlreiche Faktoren wie z. B. Hormone, Neurotransmitter und regulatorische Peptide beeinflusst (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Redmon et al., 1994; Regazzi et al., 1997). Da Glukose den stärksten Reiz für die Insulinsekretion darstellt, wurde der Einfluss von Glukose auf die IA-2 mRNA Expression und Insulinsekretion bei INS-1 Zellen überprüft. Eine erhöhte Glukosekonzentration führt über eine Erhöhung des zytosolischen ATP/ADP-Verhältnis zur Hemmung ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Es folgt eine Änderung des Membranpotentials, die Öffnung von Kalziumkanälen und ein Anstieg der intrazytoplasmatischen Kalziumkonzentration, welche dann die Freisetzung von Insulin aktiviert (Cook et al., 1984; Ashcroft et al., 1984; Malaisse, 1992; Ahren, 2000). Neben diesem Hauptmechanismus wurde von Gembal die Theorie einer vom Membranpotential unabhängigen Kontrolle der Insulinsekretion durch Glukose postuliert (Gembal et al., 1992 und 1993; Sato und Henquin, 1998). Dieser Mechanismus stellt eine Erklärung für die postprandiale biphasische Insulinsekretion dar (Aizawa et al., 1992).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Glukose konzentrations- und zeitabhängig die IA-2 mRNA Expression in INS-1 Zellen beeinflusst. Erst die Stimulierung der INS-1 Zellen ab einer Konzentration von 14 mmol/l Glukose führte während einer Langzeitinkubationsphase über 3 Tage zur Steigerung der IA-2 mRNA Expression. Ein maximaler Anstieg konnte nach einer Langzeitstimulation der INS-1 Zellen mit 21 mmol/l Glukose über 6 Tage beobachtet werden. Im Gegensatz zur Glukose-induzierten Steigerung der IA-2 mRNA Expression bei chronischer Hyperglykämie, konnte ein signifikanter Anstieg der Insulinsekretion bereits nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden beobachtet werden. Nach 3-tägiger Stimulation der INS-1 Zellen war eine deutliche Hemmung der Insulinsekretion zu beobachten, die ihr Maximum nach 6 Tagen erreichte.

Einflüsse von Glukose auf die Transkription verschiedener Gene wurden in zahlreichen Studien beschrieben. Die Expression sogenannter „immediate early growth response“ Genen wie z. B. c-fos, junB und Egr-1 werden bereits nach einer sehr kurzen Inkubationsphase von 15 bis 30 min mit erhöhter Glukose induziert. Die Stimulation der Transkription der immediate early response Genen konnten sowohl in primären Inseln als auch in Glukose-sensitiven Betazelllinien wie INS-1 und MIN 6 nachgewiesen werden (Josefsen et al., 1999; Brun et al., 1993; Roche et al., 1997).

In Betazellen wurden viele in den Glukosemetabolismus involvierte Betazellproteine identifiziert, deren Genexpression erst nach 12- bis 24-stündiger Inkubation mit hohen Glukosekonzentrationen aktiviert wird (Nielsen et al., 1985; Webb et al., 2000). In zahlreichen Studien wurde die verstärkte Expression von Enzymen wie z.B. der Glukokinase (Chen et al., 1994), des Glukosetransporters GLUT-2 (Yasuda et al., 1992), der Acetyl-CoA-Carboxylase (Brun et al., 1993) und der Pyruvatkinase beschrieben (Marie et al., 1993). Diese sind meist, wie auch die „immediate early response“ Gene, an der Adaptation an akute und chronische Änderungen der Glukosehomöostase beteiligt. Die Modulation der Genexpression durch Glukose verläuft über verschiedene Mechanismen. Eine Erhöhung der Glukosekonzentration führt zur Dephosphorylierung des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors Sp1. Die Dephosphorylierung ermöglicht eine bessere Konnektion des Transkriptionsfaktors an seine Bindungsregion im Promotor der Acetyl-CoA-Carboxylase und vermittelt somit die Glukose-induzierte Genexpressionserhöhung (Daniel et al., 1996). Eine andere Möglichkeit der Glukose-induzierter Genexpressionserhöhung wird über das „glucose response element“ vermittelt. Diese bestehen aus zwei sogenannten E-Boxen, die durch 5 bzw. 3 Basenpaare getrennt sind. Die Glukose-induzierte Aktivierung der Promotoren wird über die Bindung von „upstream stimulatory factors“ vermittelt (Diaz-Guerra et al., 1993). Eine Glukose-induzierte Stimulierung der Genexpression des Pyruvatkinase- und des Glukagongens über das „glucose response element“ konnte nachgewiesen werden (Bergot et al., 1992; Portois et al., 1999).

Es stellt sich die Frage, wie sich die späte Hochregulierung der IA-2 mRNA Expression erklären lässt. Es ist bekannt, dass eine Langzeitstimulierung mit Glukose zu einer Steigerung der metabolischen Aktivität führt und deutliche trophische Effekte auf primäre Inselzellen und INS-1 Zellen ausübt. Die trophischen Effekte bewirken unter anderem eine Steigerung der Glukokinaseaktivität, den Glykogenabbau, die Lipogenese, eine Steigerung der Zellproliferation und eine Hemmung der Glukose-induzierten Insulinausschüttung (Eizirik et al., 1992; Ling et al., 1996; Roche et al., 1998). Ein Einfluss der durch Zellproliferation bedingten unterschiedlichen Zellzahl nach Langzeitinkubation auf die Ergebnisse der RT-PCR kann in unserer Studie aufgrund der erfolgten Normalisierung der cDNA mit Hilfe des Housekeeping Gens  $\beta$ -Aktin ausgeschlossen werden.

Ob Sp1 oder andere Betazell-Transkriptionsfaktoren wie z.B. Beta-2, HNF 1 $\alpha$ , Cdx-3, Lmx-1 oder Isl-1, deren Bindung an A- bzw. E-Boxen im Promotor des Insulingens nachgewiesen wurde (Sander und German, 1997), eine Beteiligung auf die Glukose-induzierte IA-2 mRNA Expression haben, muss noch in weiteren Studien abgeklärt werden. Die Promotorregion des Ratten IA-2 Gens wurde noch nicht kloniert, wogegen die humane und murine Promotorregion bereits identifiziert ist. Sie enthalten Sp1 Bindungsstellen sowie mehrere A- und E-Boxen (Xie et al., 1998; Saeki et al., 2000). Allerdings sind die vorhandenen E-Boxen zu weit voneinander entfernt, so dass eine Vermittlung der IA-2 mRNA Expression über das „glucose response element“ unwahrscheinlich erscheint. Es kann spekuliert werden, dass eine hohe Glukosekonzentration bisher nicht bekannte Faktoren induziert, die für die Anpassung der Betazellen an eine chronische Hyperglykämie von Bedeutung sind. In Neuronen haben verschiedene Mitglieder der PTP Familie großen Anteil an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung (Stocker und Dutta, 1998). Es wäre denkbar, dass IA-2 in Betazellen ähnliche Funktionen besitzt. Frühere Studien konnten nachweisen, dass die mRNA Expression des Diabetes-assoziierten Autoantigens GAD65 ebenfalls durch Glukose gesteigert wird (Björk et al., 1992). Da somit die Expression der drei wichtigsten Autoantigene Insulin, GAD65 und IA-2 durch Glukose stimuliert wird, könnte dieser Mechanismus Bedeutung für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes besitzen. Es wäre denkbar, dass eine Erhöhung der Autoantigenexpression die Präsentation der Antigene auf antigenpräsentierenden Zellen steigert und auf diese Weise die Autoimmunreaktion aktiviert. Die klinische Relevanz dieses hypothetischen Mechanismus kann derzeit noch nicht abschließend beurteilt werden.

Neben den Glukoseeffekten wurden in der vorliegenden Studie auch zwei klassische Substanzen, Diazoxid und Glibenclamid, untersucht, deren Wirkung durch die ATP-sensitiven Kaliumkanäle vermittelt wird (Francini et al., 1997; Pirotte et al., 1995). Die Wirkung erklärt sich durch Änderungen des Membranpotentials durch eine Inhibition bzw. Steigerung der Kaliumpermeabilität, wodurch spannungsabhängige Kalziumkanäle gesteuert werden und nachfolgend die Regulation der Insulinsekretion erfolgt (Garcia-Barrado et al., 1996; Yaekura et al., 1996). Weder nach einer Behandlung mit Diazoxid noch mit Glibenclamid war eine Veränderung der IA-2 Genexpression in INS-1 Zellen zu beobachten. Überraschenderweise war auch keine signifikante Änderung der Insulinsekretion zu verzeichnen.

In früheren Studien war in INS-1 Zellen eine Steigerung der Insulinsekretion durch den Sulfonylharnstoff Tolbutamid und eine Hemmung durch Diazoxid beschrieben worden (Rutter et al., 1993; Sekine et al., 1996). Es ist bekannt, dass die INS-1 Zelllinie eine heterogene Zellpopulation aus Betazellen darstellt, aus denen durch Passagierung über längere Zeit Subpopulationen selektioniert werden können, die sich von den parenteralen Zellen unterscheiden (Hohmeier et al., 2000). Da die hier verwendeten INS-1 Zellen nicht auf die Expression der ATP-sensitiven Kaliumkanäle untersucht worden ist, könnten die fehlenden Effekte auf eine mangelnde Expression der funktionell aktiven ATP-sensitiven Kaliumkanäle zurückzuführen sein. Andere Studien konnten zeigen, dass Tolbutamid in INS-1 Zellen zwar zu einer Änderung des Membranpotentials führt, aber die Insulinsekretion bei 0,5 mM und 16,5 mM Glukose nicht steigert. Nur bei gleichzeitiger Behandlung mit Forskolin war eine Potenzierung der Insulinsekretion zu verzeichnen (Ullrich et al., 1996). In INS-1 Zellen ist somit die Steigerung der Insulinsekretion durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration von der Anwesenheit erhöhter cAMP-Spiegel abhängig. Unsere Daten könnten somit auch damit erklärt werden, dass eine alleinige Änderung des Membranpotentials und damit der intrazellulären Kalziumkonzentration die IA-2 mRNA Expression nicht beeinflusst. Da diese Hypothese in der vorliegenden Studie nicht direkt durch Messung des Membranpotentials bestätigt worden ist, kann diese Frage nicht abschließend beurteilt werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie eine quantitative RT-PCR Methode etabliert, mit der erstmals die Regulation der IA-2 Genexpression in Betazellen untersucht werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass Glukose und Glukagon zu einer signifikanten Stimulierung der IA-2 mRNA Spiegel führen und die IA-2 Genexpression sowohl durch den cAMP wie auch der PKC Transduktionsweg moduliert wird. Diese koordinierte Regulation der IA-2 mRNA Expression unterstützt die Hypothese, dass IA-2 möglicherweise eine wichtige Bedeutung für die Betazellfunktion darstellt. Diese Befunde stellen die Grundlage für zukünftige Studien dar, in denen die genauen molekularen Mechanismen in der IA-2 Regulation geklärt werden sollen.

## 5 Zusammenfassung

Thi Bang Tam Nguyen

### Regulation der Expression des Diabetes-assoziierten Autoantigens IA-2 in INS-1 Betazellen

**Zielsetzung:** Die Protein Tyrosinphosphatase IA-2 stellt neben dem GAD 65 und Insulin ein bedeutendes Autoantigen für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes dar. IA-2 ist überwiegend in den sekretorischen Granula von neuroendokrinen Zellen lokalisiert. In einer Vielzahl von Studien wurde die Immunantwort gegen IA-2 bei Prädiabetikern und bei Patienten mit neu diagnostiziertem Diabetes untersucht. Allerdings ist bis heute über die biologische Funktion und Regulation dieses wichtigen Autoantigens noch wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung von metabolischen und hormonellen Einflüssen auf die IA-2 mRNA Expression, um die ersten Aussagen über die Regulation von IA-2 treffen zu können.

**Methodik:** Für den Nachweis der IA-2 mRNA Expression wurde eine kompetitive RT-PCR mit internen homologen Kompetitorfragmenten etabliert. Die Expression wurde an einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) untersucht. Die partiell glukosesensitiven INS-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 7 mM Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol kultiviert und mit den folgenden Zusätzen für 6 Stunden bis 6 Tage stimuliert: 10  $\mu$ M Forskolin, 100  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), 1  $\mu$ M Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), 10, 15 und 21 mM Glukose, 1 und 10  $\mu$ M Glukagon, 1 und 10  $\mu$ M Somatostatin, 5  $\mu$ g/ml Glibenclamid oder 22,5  $\mu$ g/ml Diazoxid.

In der ersten RT-PCR wurde die cDNA mit dem Housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin auf den gleichen Gehalt justiert. In einer zweiten PCR wurde die IA-2 mRNA Expression untersucht. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt.

**Ergebnisse:** Die cAMP Agonisten Forskolin und IBMX und das Hormon Glukagon stimulierten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit die IA-2 mRNA Expression. Der höchste Stimulationseffekt mit dem Faktor 5,4 konnte nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit 10  $\mu$ M Forskolin über 48 Stunden beobachtet werden. Auch in primären Inseln konnte nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M Forskolin über 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression beobachtet werden. Glukose führte zu einer zeit- als auch konzentrationsabhängige Hochregulation der IA-2 mRNA Expression. PMA hemmte nach 24 Stunden die IA-2 mRNA Expression um 50%. Im Vergleich zu den basalen Bedingungen konnte nach Stimulierung der INS-1 Zellen mit Somatostatin, Glibenclamid oder Diazoxid keine Änderung der IA-2 Genexpression beobachtet werden.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass in Betazellen die IA-2 Genexpression über den cAMP und PKC Transduktionsweg reguliert wird. Glukagon und Glukose stellen physiologische Stimulatoren der IA-2 mRNA Expression dar. Die koordinierte Regulation der IA-2 mRNA Expression könnte möglicherweise eine wichtige Bedeutung für die Betazellfunktion besitzen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aanstoot HJ**, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose LP, Fey S, Ludvigsson J, Landin M, Bruining J, Maclaren N, Åkerblom HK, Baekkeskov S. 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* 1996; 97: 2772-2783.

**Abel KB**, Lehr S, Ullrich S. Adrenalin-, not somatostatin-induced hyperpolarisation is accompanied by a sustained inhibition of insulin secretion on INS-1 cells. Activation of sulphonylurea  $K^+_{ATP}$  channels is not involved. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1996; 432: 89-96.

**Ahren B**. Autonomic regulation of islet hormone secretion-Implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43: 393-410.

**Akerblom HK**, Knip Mikael. Putative Environmental Factors in Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab. Rev.* 1998; 14: 31-67.

**Aizawa T**, Sato Y, Komatsu M, Hashizume K. ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent, insulinotropic action of glucose in the B-cells. *Endocr Regul* 1992; 26: 159-62.

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

**Arkhammar P**, Nilsson T, Welsh M, Welsh N, Berggren PO. Effects of protein kinase C activation on the regulation of the stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 1989; 264: 207-215.

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

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

**Ashcroft FM**, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B cells. *Nature* 1984; 312: 446-8.

**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* 1992; 339:458-459.

**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 [see comments]. *J Clin Invest* 1994; 94: 2125-2129.

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

**Aust G**, Hofmann A, Laue S, Rost A, Kohler T, Scherbaum WA. Human thyroid carcinoma cell lines and normal thyrocytes: expression and regulation of matrix metalloproteinase-1 and tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1 messenger-RNA and protein. *Thyroid* 1997; 7: 713-24.

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

**Baekkeskov S**, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter OH, DeCamilli P, Camilli PD. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase [published erratum appears in Nature 1990 Oct 25; 347(6295): 782]. *Nature* 1990; 347: 151-156.

**Banatvala JE**, Bryant J, Schernthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, De Silva LM, Menser MA, Silink M. Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet* 1985; 1: 1409-1412.

**Berggren PO**, Rorsman P, Efendic S et al.. Mechanisms of action of entero-insular hormones islet peptides and neural input of the insulin secretory process. In: Flatt PR, ed. *Nutrient Regulation of Insulin Secretion*. London: *Portland Press* 1992: 289-318.

**Berggren PO**, Arkhammer P, Islam MDS et al.. Molecular mechanisms involved in regulating cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in pancreatic B-cells. In: Flatt PR, Lenzen S, eds. *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-cell Research*. London: Smith-Gordon and Co. 1994: 201-11.

**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* 1992. 20: 1871-1877.

**Bingley PJ**, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46: 1701-1710.

**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* 1992. 75: 1574-1576.

**Bottazzo GF**, Florin CA, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; 2: 1279-1283.

**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* 1993; 268: 18905-18911.

**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 USA* 1992; 89: 2115-2119.

**Buchner K**. The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. Springer Verlag. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 1-11.

**Cai T**, Krause MW, Odenwald WF, Toyama R, Notkins AL. The IA-2 gene family: homologs in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and zebrafish. *Diabetologia* 2001; 44: 81-88.

**Castano L**, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 647-79.

**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* 1994. 94: 1616-1620.

**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* 1990; 172: 789-794.

**Clements GB**, Galbraith DN, Taylor KW. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes [see comments]. *Lancet* 1995; 346: 221-223.

**Comb M**, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM. A cyclic AMP- and phorbol-ester-inducible DNA element. *Nature* 1986; 323: 353-356.

**Cook DL**, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks potassium channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984; 311: 271-3.

- 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* 1996; 271: 14692-14697.
- Della FM**, Servillo G, Sassone CP. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett* 1997; 410: 22-24.
- Detimary P**, Dejonghe S, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F, Henquin JC. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in  $\beta$ -cells but not in  $\alpha$ -cells, and are also observed in human islets. *J Biol Chem* 1998; 273: 33905-33908.
- 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* 1993; 13: 7725-7733.
- Dippe SE**, Bennett PH, Miller M, Maynard JE, Berquist KR. Lack of causal association between Coxsackie B4 virus infection and diabetes. *Lancet* 1975; 1: 1314-1317.
- Dirkx R**, Hermel JM, Rabin DU, Solimena M. ICA 512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein, is concentrated in neurosecretory granule membranes. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 243-246.
- Dittler J**, Seidel D, Schenker M, Ziegler AG. GAD/IA2-combi determination as first-line screening for improved prediction of type 1 diabetes in relatives. *Diabetes* 1998; 47: 592-597.
- Dorman JS**, La Porte RE, Stone RA, Trucco M. Worldwide differences in the incidence of type 1 diabetes are associated with aminoacid variation of position 57 of the HLA-DQ  $\beta$  chain. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87:7370-7374.
- Dotta F**, Previti M, Lenti L, Dionisi S, Casetta B, D'Erme M, Eisenbarth GS, Di Mario U. GM2-1 pancreatic islet ganglioside: identification and characterization of a novel islet-specific molecule. *Diabetologia* 1995; 38: 1117-1121.
- Dotta F**, Falorni A, Tiberti C, Dionisi S, Anastasi E, Torresi P, Lernmark Å, Di Mario U. Autoantibodies to the GM2-1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset. *J Autoimmun* 1997; 10: 585-588.
- Eizirik DL**, Korbitt GS, Hellerstrom C. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J Clin Invest* 1992; 90: 1263-1268.
- 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* 1998; 47: 566-569.
- Foulkes NS**, Sassone-Corsi P. More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell* 1992; 68: 411-414.
- Francini F**, Pirotte B, Gagliardino JJ. Effect of activators and inhibitors of K<sup>+</sup> channels on insulin secretion in the amphibian pancreas. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105: 66-70.
- Garcia-Barrado MJ**, Jonas JC, Gilon P, Henquin JC. Sulphonylureas do not increase insulin secretion by a mechanism other than a rise in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic B-cells. *Eur J Pharmacol* 1996; 289: 279-86.
- Gerstein HC**. Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 1994; 17: 13-19.
- Gembal M**, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 1288-95.

**Gembal M**, Detimary P, Gilon P, Goa ZY, Henquin JC. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphat-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 1993; 91: 871-80.

**Hagopian WA**, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark Å. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1993; 42: 631-636.

**Hatfield EC**, Hawkes CJ, Payton MA, Christie MR. Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 1327-1333.

**Hellman B**, Gylfe E, Grpengiesser E, Lund PE, Marcstrom A. Cytoplasmic calcium and insulin secretion. In: Flatt PR, ed. *Nutrient Regulation of Insulin Secretion*. London: Portland Press, 1992: 213-46.

**Henquin JC**, Gembal M, Detimary P, Gao ZY, Warnotte C, Gilon P. Multisite control of insulin release by glucose. *Diabetes Metab* 1994; 20: 132-137.

**Hermel JM**, Dirx R Jr, Solimena M. Post-translational modifications of ICA512, a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 2609-2620.

**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* 1987; 246: 489-493.

**Hoeffler JP**, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988; 242:1430-1433.

**Hohmeier HE**, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2000; 49: 424-30.

**Holst JJ**. Role of classical and peptidergic neurotransmitters in insulin secretion. In: Flatt PR, ed. *Nutrient Regulation of insulin Secretion. Portland Press Research Monograph 1* 1992; 9: 173-91.

**Howell SL**, Jones PM, Persaud SJ. Regulation of insulinsecretion: the role of second messengers. *Diabetologia* 1994; 37 (Suppl.2): S30-5.

**Hyöty H**, Hiltunen M, Lönnrot M. Enterovirus infections and insulin dependent diabetes mellitus - evidence for causality. *Clin Diagn Virol* 1998; 9: 77-84.

**Josefsen K**, Sorensen LR, Buschard K, Birkenbach M. Glucose induces early growth response gene (Egr-1) expression in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1999; 42: 195-203.

**Takei M**, Nakazaki M, Tanaka H. Effects of somatostatin and galanin on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. In: Flatt PR, Lenzen S, eds. *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-cell Research* 1994; 325-30.

**Katz JD**, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185-1188.

**Kawai K**, Yokota C, Ohashi S, Watanabe Y, Yamashita K. Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats. *Diabetologia* 1995; 38: 274-6.

**Kieffer TJ**, Heller RS, Unson CG, Weir GC, Habener JF: Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1996; 137: 5119-5125.

**Knip M**, Karjalainen J, Åkerblom HK, The Childhood Diabetes in Finland Study Group. Islet cell antibodies are less predictive of IDDM among unaffected children in the general population than in sibs of children with diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1670-1673.

- Koya D**, King GL. Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-66.
- Kulmala P**, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Loppinen T, Dyrberg T, Åkerblom, 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* 1998; 101: 327-336.
- 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* 1994; 13: 505-514.
- Lebrun P**, Antoine MH, Ouedrago R, Kane C, Dunne M, Hermann M, Herchuelz A, Masereel B, Delarge J, de Tullio P, Pirotte B. Activation of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 156-62.
- Leslie RDG** und Pyke DA. Insulin dependent diabetes is probably due to environmental effect during childhood [letter]. *BMJ* 1997; 315: 1017.
- Leslie RD**, Atkinson MA, Notkins AL: Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1999; 42:3-14.
- Lester LB**, Langeberg LK, Scott JD: Anchoring of protein kinase A facilitates hormone-mediated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14942-14947.
- Ling Z**, Kiekens R, Mahler T, Schuit FC, Pipeleers-Marichal M, Sener A, Klöppel G, Malaisse WJ, Pipeleers DG: Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 1996; 45: 1774-1782.
- Liu JP**. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 1-29.
- Löffler G**, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1998; 6.Auflage: 788-791.
- Lohmann T**, Leslie RDG, Hawa M, Geysen M, Rodda S, Londei M. Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus [see comments]. *Lancet* 1994; 343: 1607-1608.
- Lohmann T**, Halder T, Engler J, Morgenthaler NG, Khoo-Morgenthaler UY, Schröder S, Seissler J, Scherbaum WA, Kalbacher H. T cell reactivity to DR\*0401- and DQ\*0302-binding peptides of the putative autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999 ; 107: 166-171.
- Lönnrot M**, Salminen K, Knip M, Kulmala P, Savola K, Åkerblom HK. Enterovirus RNA positivity is a risk factor for Beta-cell autoimmunity and clinical IDDM - a prospective study. *Diabetes* 1998; 47: A33.
- 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. USA* 1996; 93: 2307-2311.
- 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* 1993. 268: 23881-23890.
- Maclaren NK** und Atkinson MA. Insulin-dependent diabetes mellitus: the hypothesis of molecular mimicry between islet cell antigens and microorganisms. *Mol Med Today* 1997; 3: 76-83.
- Malaisse WJ**. Insulin Biosynthesis and secretion in vitro. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet B, eds. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester John Wiley and Sons, 1992: 261-83.
- Matschinsky FM**, Glaser B, Magnuson MA. Pankreatic  $\beta$ -cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 1998; 47: 307-315.

- McDermott AM**, Sharp GWG. Multiple roles of cyclic AMP in the pancreatic B-cells. In: Flatt PR, Lenzen S, eds. *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-cell Research*. London: Smith Gordon and Co., 1994: 243-9.
- 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* 1980; 66: 1334-1338.
- Mein CA**, Esposito L, Dunn MG, Johnson GL, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nature Genetics* 1998;19: 297-300.
- Morgenthaler NG**, Seissler J, Achenbach P, Glawe D, Payton M, Meinck HM, Christie MR, and 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* 1997; 25: 203-211.
- Mutschler E**, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen, *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart 2001; 8.Auflage.
- Newgard CM**, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic  $\beta$ -cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 689-719.
- 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* 1985; 260: 13585-13589.
- Nilsson T**, Arkhammer P, Rorsman P, Berggren PO. Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein: an effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* 1989; 264: 973-80.
- Nonogaki K**. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000; 43: 533-549.
- Norris JM** und Scott FW. A meta-analysis of infant diet and insulin-dependent diabetes mellitus: do biases play a role? *Epidemiology* 1996; 7: 87-92.
- Notkins AL**, Lan MS, Leslie RD. IA-2 and IA-2beta: the immune response in IDDM. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 85-93.
- Owerbach D**, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB: The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature* 1980; 286: 82-84.
- Palmer JP**, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983; 222 : 1337-1339.
- 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* 1995; 96: 1506-1511.
- Persaud SJ**, Jones PM, Howell SL. The role of protein kinase C in insulin secretion. In: Flatt PR, ed. Nutrient Regulation of insulin Secretion. *Portland Press Research Monograph 1* 1992; 12: 247-69.
- Pirrotte B**, Fontaine J, Lebrun P. New activators of potassium channels : design, pharmacology and therapeutic perspectives. *J Pharm Belg* 1995; 50: 167-78.
- 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* 1999. 274: 8181-8190.
- Pozzilli P**, Visalli N, Buzzetti R, Cavallo MG, Marietti G, Hawa M, Leslie RD. Metabolic and immune parameters at clinical onset of insulin-dependent diabetes: a population-based study. IMDIAB Study Group. Immunotherapy Diabetes. *Metabolism* 1998; 47: 1205-10.

- Prentki M**, Matschinsky FM:  $Ca^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 1987; 67: 1185-1248.
- Prentki M**, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 1997; 40: 32-41.
- Rabinovitch A**. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14:129-151.
- Redmon JB**, Towle HC, Robertson RP. Regulation of human insulin gene transcription by glucose, epinephrine, and somatostatin. *Diabetes* 1994; 43: 546-551.
- Regazzi R**, Verchere CB, Halban PA, Polonsky KS. Insulin production: from gene to granule. *Diabetologia* 1997; 40: B33-B38.
- Richter W**, Seissler J, Northemann W, Wolfahrt S, Meinck HM, Scherbaum WA. Cytoplasmic islet cell antibodies recognize distinct islet antigens in IDDM but not in stiff man syndrome. *Diabetes* 1993a; 42: 1642-1648.
- 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* 2001; 49: 767-776.
- Roche E**, Assimacopoulos JF, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B, Asfari M, Prentki M. Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* 1997; 272: 3091-3098.
- Roche E**, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos JF, Thumelin S, Brun T, Corkey BE, Saha AK, Prentki M. Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 1998; 47: 1086-1094.
- Rutter GA**, Theler JM, Murgia M, Wollheim CB, Pozzan T, Rizzuto R. Stimulated  $Ca^{2+}$  influx raises mitochondrial free  $Ca^{2+}$  to supramicromolar levels in a pancreatic beta-cell line. Possible role in glucose and agonist induced insulin secretion. *J Biol Chem* 1993; 268: 22385-90.
- Saeki K**, Xie J, Notkins AL. Genomic structure of mouse IA-2: comparison with its human homologue. *Diabetologia* 2000. 43: 1429-1434.
- Sander M**, German MS. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 1997; 75: 327-340.
- Sato Y**, Henquin JC. The  $K^{+}$ -ATP Channel-Independent Pathway of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes* 1998; 47: 1713-1721.
- Scherbaum WA**. Type 1, type 2 diabetes, MODY and LADA. Making a differential diagnosis. *MMW Fortschr Med* 2001; 144: 45-48.
- Scheuermann RH**, Bauer SR. Polymerase chain reaction-based mRNA quantification using an internal standard: Analysis of oncogen expression. *Methods Enzymol* 1993; 218: 446-473.
- Schöfl C**, Börger J, Mader T, Waring M, Mühlen A, Brabant G. Tolbutamid and diazoxide modulate phospholipase C-linked  $Ca^{2+}$  signaling and insulin secretion in  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E639-E647.
- Schuit F**, Pipeleers D. Differences in adrenergic recognition by pancreatic A and B-cells. *Science* 1986; 232: 875-7.
- Seaquist ER**, Armstrong MB, Gettys TW, Walseth TF. Somatostatin selectively couples to G(o) alpha in HIT-T15 cells. *Diabetes* 1995; 44: 85-89.

**Schranz DB**, Lernmark A. Immunology in diabetes: an update. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 1-2.

**Seissler J**, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA. Prevalence of autoantibodies to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 92: 1394-1399.

**Seissler J**, Morgenthaler NG, Achenbach P, Lampeter EF, Glawe D, Payton M, Christie M, Scherbaum WA. Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives of patients with IDDM. The DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventions-Studie. *Diabetologia* 1996; 39: 1351-1356.

**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* 1998; 41: 891-897.

**Sekine N**, Ullrich S, Regazzi R, Pralong WF, Wollheim CB. Postreceptor signalling of growth hormone and prolactin and their effects in the differentiated insulin-secreting cell line, INS-1. *Endocrinology* 1996; 137: 1841-50.

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

**Shuit F**, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M. Metabolic fate of glucose in purified islet cells: glucose-regulated anaplerosis in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 18572-18579.

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

**Steiner DF**, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet.* 1985; 19: 463-484.

**Stoker A**, Dutta R. Protein tyrosine phosphatases and neural development. *Bioassays* 1998; 20: 463-472.

**Stryer L**. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg 1990; 5. Auflage.

**Susini S**, Roche E, Prentki M, Schlegel W. Glucose and glucocretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic  $\beta$ (INS-1) cells. *FASEB J* 1998; 12: 1173-1182.

**Tamai KT**, Monaco L, Nantel F, Zazopoulos E, Sassone CP: Coupling signalling pathways to transcriptional control: nuclear factors responsive to cAMP. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 121-139.

**Tian J**, Lehmann PV, Kaufman DL. T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J Exp Med* 1994; 180: 1979-1984.

**Tiedke M**, Lenzen S. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT2 gene expression in pancreatic B-cells and liver from rats. *Biochem J* 1995; 308: 139-44.

**Thomas L**. *Labor und Diagnose*. TH-Books Verlagsgesellschaft GmbH Frankfurt 1998; 5. Auflage.

**Thorens B**, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* 1988; 55: 281-290.

**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* 1992; 89: 8641-8645.

**Thorens B**, Deriaz N, Bosco D, DeVos A, Pipeleers D, Schuit F, Meda P, Porret A: Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 8075-8081.

- Tuvemo T**, Dahlquist G, Frisk G, Blom L, Friman G, Landin OM, Diderholm H. The Swedish childhood diabetes study III: IgM against coxsackie B viruses in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic children--no evidence of increased antibody frequency. *Diabetologia* 1989; 32: 745-747.
- Ullrich S**, Abel KB, Lehr S, Greger R. Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1996; 432: 630-636.
- Van Schravendijk C**, Foriers A, Hooghe-Peters EL et al.. Pancreatic hormone receptors on islet cells. *Endocrinology* 1985; 117: 841-8.
- Vardi P**, Ziegler AG, Mathews JH, Dib S, Keller RJ, Ricker AT, Wolfsdorf JI, Herskowitz RD, Rabizadeh A, Eisenbarth GS, Soeldner JS. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 1988; 11: 736-739.
- Verge CF**, Howard NJ, Rowley MJ, Mackay IR, Zimmet PZ, Egan M, Hulinska H, Hulinsky I, Silvestrini RA, Kamath S, Eisenbarth, GS. Anti-glutamate decarboxylase and other antibodies at the onset of childhood IDDM: a population-based study. *Diabetologia* 1994; 37: 1113-1120.
- Verge CF**, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926-933.
- Vreugdenhil GR**, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR 3 molecule. *Diabetologia* 1998; 41: 40-46.
- Wasmeier C** und Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 1996; 27: 18161-18170.
- 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 USA* 2000; 97: 5773-5778.
- Wicker LS**, Chen SL, Nepom GT, Elliott JF, Freed DC, Bansal A, Zheng S, Herman A, Lernmark Å, Zaller DM, Peterson LB, Rothbard JB, Cummings R, Whiteley PJ. Naturally processed T cell epitopes from human glutamic acid decarboxylase identified using mice transgenic for the type 1 diabetes-associated human MHC class II allele, DRB1\*0401. *J Clin Invest* 1996; 98: 2597-2603.
- Wiest-Ladenburger U**, Hartmann R, Hartmann U, Berling K, Boehm BO, Richter W. Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes* 1997; 46: 565-571.
- Wollheim CB**, Regazzi R. Protein kinase C in insulin releasing cells. Putative role in stimulus secretion coupling. *FEBS Lett* 1990; 268: 376-380.
- Wollheim CB**, Meda P, Halban PA. Establishment and culture of insulin-secreting beta cell lines. *Methods Enzymol* 1990; 192: 223-35.
- Xie J**, Zhang B, Lan MS, Notkins AL. Genomic structure and promoter sequence of the insulin-dependent diabetes mellitus autoantigen, IA-2 (PTPRN). *Genomics* 1998; 54: 338-343.
- Yaekura K**, Kakei M, Yada T. cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamid to increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1996; 45: 295-301.
- 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* 1992. 41: 76-81.

**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* 2000; 97:1701-1706.

**Zambre Y**, Ling Z, Chen MC, Hou X, Woon CW, Culler M, Taylor JE, Coy DH, Van Schravendijk C, Schuit F, Pipeleers DG, Eizirik DL. Inhibition of human pancreatic islet insulin release by receptor-selective somatostatin analogs directed to somatostatin receptor subtype 5. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 1159-64.

**Zawalich WS**, Zawalich KC, Ganesan S, Calle R, Rasmussen H. Effects of the phorbol ester phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on islet-cell responsiveness. *Biochem J* 1991; 278: 49-56.

**Zawalich WS**, Zawalich KC. Regulation of insulin secretion via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel independent mechanisms: role of phospholipase C. *Am J Physiol* 1997; 272: E671-E677.

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

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Für die Vergabe dieser äußerst interessanten Aufgabenstellung, die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie fruchtbare Anregungen und Diskussionen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn PD Dr. med. Jochen Seissler bedanken. Durch die Möglichkeit, fast zu jeder Zeit Ergebnisse vorstellen zu können, wurde eine effektive und erfolgreiche Durchführung der Dissertation gewährleistet.

Als Leiter der klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Abteilung in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Jochen Seissler durchführen zu können.

Für die intensive Unterstützung, kritische Diskussionen und die Begleitung bei der Durchführung der Experimente gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Holger Steinbrenner. Insbesondere danke ich Herrn Dr. H. Steinbrenner für die fachlich kompetente, stets geduldige und freundliche Betreuung, was eine zügige Durchführung der Experimente ermöglichte.

Durch ihren persönlichen Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Arbeiten bin ich Frau Dr. rer. nat. Monika Herten, Frau PD Dr. rer. nat. Gabriela Aust und Frau Ulrike Wohlrab zu Dank verpflichtet. Ausserdem danke ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. J. Seissler.

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.

Ganz großer Dank gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meine Eltern, ohne deren stets gewährte Unterstützung und Vertrauen mir das Studium der Medizin und die Anfertigung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Thi Bang Tam Nguyen	Geburtsdatum:	27.10.1972
Anschrift:	Fritz-Brandt-Weg 7 40593 Düsseldorf	Geburtsort:	Saigon Vietnam
	Tel. 0211-706222	Familienstand:	ledig
	E-mail: nguyethi@uni-duesseldorf.de	Staatsangehörigkeit:	deutsch

1/1981 bis 6/1982 : Flucht aus Vietnam als „boat-people“ und Aufenthalt auf den Philippinen bis zur Einreise nach Deutschland im Juni 1982

### Schulbildung:

- ◇ 1983 - 1985 Städtische Grundschule in Düsseldorf
- ◇ 1985 - 1987 Theodor-Litt Realschule in Düsseldorf
- ◇ 1987 - 1994 Koblenzer Gymnasium in Düsseldorf mit dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung:

- ◇ Okt. 1994 Beginn des Medizinstudiums
- ◇ Sept. 1996 Physikum
- ◇ Aug. 1997 I. Staatsexamen
- ◇ Sept. 1999 II. Staatsexamen
- ◇ 1999 - 2000 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- ◇ Nov. 2000 III. Staatsexamen

### Promotion: 1997-1999

- ◇ "Regulation of the Diabetes-Associated Autoantigen IA-2 in INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cells"

### Ärztin im Praktikum:

- ◇ 02.01.2001 – 01.07.2002 in der Klinik und Poliklinik für Endokrinologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### 7.3 Publikationen

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* 2000; 49: 1137-1141.

Steinbrenner H, **Nguyen TBT**, 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* 2002; 143: 3839-3845.