

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

**Die Interaktion
von PDX-1 und CK2 unter dem Einfluss von
Glucose in den β -Zellen des Pankreas**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der

Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2014

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Sabrina Klein, geborene Welker
geb. am 01.09.1986 in Neunkirchen (Saar)

Abkürzungsverzeichnis

λ	Absorption
A	Alanin
A. dest.	Destilliertes Wasser
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BETA2	"Beta-cell E-box Transcriptional Activator 2"
bp	Basenpaare
Bridge-1	"26S Proteasome non ATPase Regulatory Subunit 9"
BSA	"bovine serum albumin"(Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Präzipitationskontrolle
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
C/EBP δ	"CCAAT/Enhancer-binding Protein Delta"
Ci	Curie
CK2	Proteinkinase CK2
CMV	Cytomegalovirus
cpm	"counts per minute" (Zählimpulse pro Minute)
C-Terminus	Carboxyterminus
CX-4945	Silmitasertib
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
deion.	deionisiert
dl	Deziliter
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc-Domäne	"crystallisable fragment"-Domäne
FCS	"fetal calf serum" (fötales Kälberserum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GLUT2	Glucose-Transporter 2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HD	Homeodomäne
HDACs	Histon-Deacetylasen
IAPP	"Islet Amyloid Polypeptide"
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
IP	Immunpräzipitat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	micro
m	milli
M	molar
MafA	"V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A"
max	maximal
mg	Milligramm
MODY	"Maturity Onset Diabetes of the Young"

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	"messenger RNA" (Boten-RNA)
n	nano
NeuroD1	"Neurogenic Differentiation Factor 1"
NLS	Kernlokalisationsignal
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
oligo-dT	Oligo-deoxyThymin
p300	Histon-Acetyltransferase "EA1- associated Protein p300"
PBX-1	"Pre-B-cell Leukemia Transcription Factor 1"
PBS	"phosphate buffered saline"
PCA	p-Cumarsäure
PCIF-1	"PDX-1 C-Terminal Interacting Factor 1"
PCR	"polymerase chain reaction" (Polymerase Kettenreaktion)
PDX-1	"Pancreatic Duodenal Homeobox-1"
PIK3	"Phosphatidylinositol 3-Kinase"
PLA	"Proximity Ligation Assay"
Poly-A	Polyadenylierung
POZ-Domäne	"Pox Virus and Zinc Finger"-Domäne
PTD	Protein-Transduktionsdomäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QC	Qualitätskontrolle
qRT- <i>Real time</i> -PCR	Quantitative Reverse Transkriptase <i>Real time</i> -PCR
Quinalizarin	1,2,5,8-tetrahydroxyanthraquinon
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	"revolutions per minute" (Umdrehungen pro Minute)
S	Serin

Abkürzungsverzeichnis

SAPK	"Stress-activated Protein Kinase"
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sepharosekontrolle
siRNA	"small interfering RNA"
SPOP	"Speckle-type Protein"
Syt1	Synaptotagmin1
T	Threonin
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TBS	"tris-buffered saline"
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TRAF-Domäne	"Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor"-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Vorpräzipitat
ZE	Zellextrakt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	4
3.1 Die Funktion des Pankreas	4
3.2 Der pankreatische Transkriptionsfaktor PDX-1 - Struktur und Funktion.....	5
3.3 Die Proteinkinase CK2.....	10
3.4 Die CK2 und der Kohlenhydratstoffwechsel	11
3.5 PDX-1 und CK2.....	12
3.6 Zielsetzung der Arbeit.....	14
4. Materialien	16
4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme.....	16
4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
4.1.2 Chemikalien	18
4.1.3 Radiochemikalien.....	19
4.1.4 Enzyme.....	20
4.1.5 Experimentelle Kits.....	20
4.2 Nährmedien für Bakterien	20
4.3 Molekulargewichtsmarker.....	21
4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker.....	21
4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker.....	21
4.4 Antikörper	22
4.4.1 Primärantikörper.....	22
4.4.2 Sekundärantikörper	23
4.5 Bakterienstämme	24
4.6 Zelllinien	24
4.7 Primer	25
4.8 Plasmide	26

4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine	27
4.10 Puffer und Lösungen	27
4.11 Computerprogramme	36
5. Methoden	37
5.1 DNA-Techniken	37
5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion	37
5.1.2 Agarosegelelektrophorese	38
5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
5.1.4 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	39
5.1.5 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	39
5.1.6 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.2 RNA-Techniken	40
5.2.1 mRNA-Isolation	40
5.2.2 Reverse Transkription	41
5.2.3 Phenol/Chloroform Extraktion	41
5.2.4 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT- <i>Real time</i> -PCR)	42
5.3 Zellkulturtechniken	44
5.3.1 Kultivieren der Zellen	44
5.3.2 Passagieren der Zellen.....	44
5.3.3 Tauen von Zellen.....	45
5.3.4 Einfrieren von Zellen.....	45
5.3.5 Ernten von Zellen	45
5.3.6 Beseitigung von Kontaminationen	45
5.3.7 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer.....	46
5.3.8 Transiente Transfektion von Zellen mit Turbofect®	46
5.4 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden	47
5.4.1 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse	47
5.4.2 Herstellung von Zellextrakten aus Gewebestücken	47
5.4.3 Proteinquantifikation nach Bradford	47
5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
5.4.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	49
5.4.6 Western Blot Analyse.....	49

5.4.7 Immunologischer Proteinnachweis	50
5.4.8 Coimmunpräzipitation.....	50
5.4.9 <i>In vitro</i> -CK2 Kinase-Assay	51
5.4.10 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von gereinigten, rekombinanten Proteinen.....	52
5.4.11 Autoradiographie.....	52
5.4.12 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	53
5.4.13 "Proximity Ligation Assay" (PLA)	53
5.4.14 Lagerung von Gewebeschnitten	55
5.4.15 Färbung von Gewebeschnitten	55
5.4.16 Luciferase-Assay	56
5.4.17 "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA).....	57
6. Ergebnisse	58
6.1 PDX-1 und CK2 in murinen Inseln.....	58
6.2 Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 in MIN6-Zellen	70
6.3 Auswirkungen einer PDX-1-Phosphorylierung durch CK2 auf die.....	97
PDX-1-Zielgene Insulin, Glucokinase und GLUT2	97
6.4 Einfluss von Glucose und der CK2 auf die Insulinsekretion	108
6.5 Regulation der Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 durch Glucose und CK2.....	113
7. Diskussion	121
8. Literaturverzeichnis.....	143
9. Publikationen.....	170
Danksagung.....	171
Lebenslauf	172

1. Zusammenfassung

Aus der Analyse der Wechselwirkung des pankreatischen Transkriptionsfaktors PDX-1 und der Proteinkinase CK2 unter Einfluss von Glucose konnten im Rahmen dieser Dissertation folgende Resultate gezogen werden: Colokalisationsstudien von PDX-1 mit den katalytischen Untereinheiten der CK2 in den β -Zellen der murinen Inseln sowie die Assoziation von PDX-1 und CK2 α mittels PLA und Coimmunpräzipitationsanalysen ermöglichten es, die biologische Bedeutung der Proteine im Mausmodell zu bestätigen. Auf Zellkulturebene konnte in Experimenten mit MIN6-Zellen eine Glucose-abhängige Erhöhung der CK2-Kinaseaktivität ohne gleichzeitige Änderung der Proteinexpression nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Stöchiometrie der CK2 in pankreatischen β -Zellen weder von Insulin noch von Glucose beeinflusst wird. Es konnte jedoch aufgedeckt werden, dass die CK2-Untereinheiten infolge einer Stimulation mit Glucose in den β -Zellen eine Translokation in den Zellkern, ähnlich wie PDX-1, vollziehen. Eine Glucosestimulation der β -Zelle hat zudem einen Einfluss auf die Assoziation beider Proteine in den pankreatischen Zellen. PDX-1 selbst hat keine Auswirkung auf die Aktivität der Proteinkinase. Analysen zu den PDX-1-Zielgenen Insulin, Glucokinase und GLUT2 mit Reporterassays lassen auf eine Promotor-spezifische Regulation durch die CK2, abhängig von der PDX-1-Phosphorylierung schließen. Weiterhin konnte kein Einfluss der CK2-Phosphorylierung von PDX-1 auf die Insulinsekretion über das PDX-1-Zielgen Synaptotagmin1 detektiert werden. Es war ferner möglich, einen Zusammenhang der Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 mit der Glucosekonzentration der β -Zelle zu beweisen sowie die CK2-abhängige Assoziation der Proteine. Die durch CK2-Phosphorylierung von PDX-1 hervorgerufene verstärkte Bindung an PCIF-1, wodurch die Stabilität und Transaktivierungsfähigkeit von PDX-1 vermindert wird, ist möglicherweise der Schlüssel für die Reduktion der Insulingentranskription über PDX-1 unter Hochglucosestimulation. Die bisher erhaltenen Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung von Glucose auf die Interaktion von PDX-1 und der CK2 in pankreatischen β -Zellen lassen sich in folgendem Schaubild zusammenfassen (Abbildung 1).

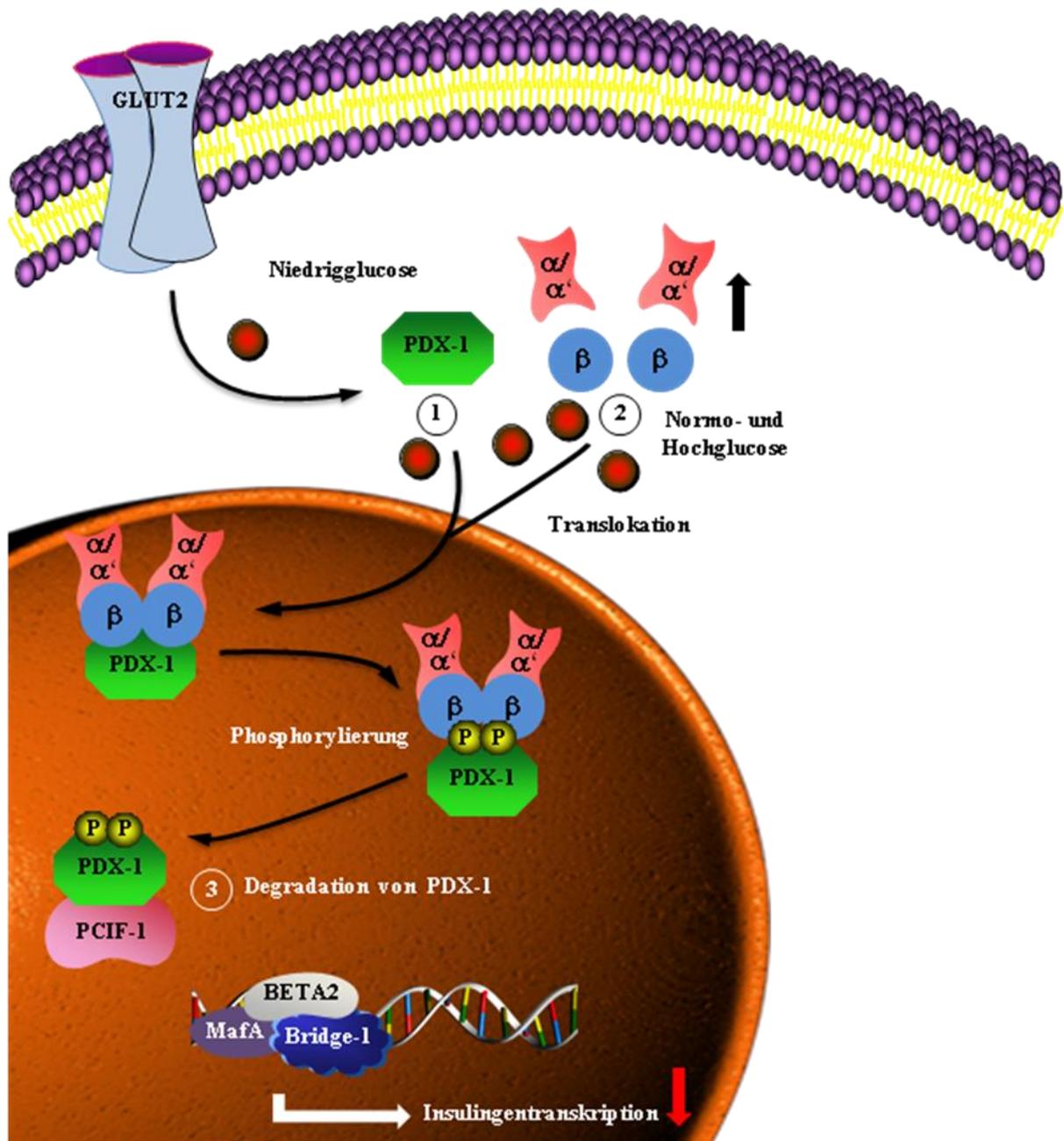


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion von PDX-1 und CK2 unter Einfluss von Glucose in der pankreatischen β -Zelle. In Anwesenheit von Niedrigglucose (2.5 mM) befinden sich der pankreatische Transkriptionsfaktor PDX-1 und die Proteinkinase CK2 im Cytoplasma der β -Zelle (1). Normo- oder Hochglucose (5 mM bzw. 25 mM) stimuliert die Aktivität der CK2 und es findet eine Translokation von PDX-1 und der CK2, unabhängig voneinander, in den Zellkern der β -Zelle statt (2). Dort kann die Phosphorylierung von PDX-1 durch die Proteinkinase erfolgen, was in einer verstärkten Bindung von PCIF-1 an PDX-1 resultiert. PCIF-1 vermindert die Transaktivierungsfähigkeit von PDX-1 und es kommt zu einer Reduktion der Insulinentranskription (3).

2. Summary

The analysis of the interaction between the pancreatic transcription factor PDX-1 and protein kinase CK2 showed the following results: In the primary mouse model, it was possible to detect an impact of both proteins by finding PDX-1 colocalized with the catalytic CK2-subunits in the β -cells of the islets, as well as an association of PDX-1 and CK2 α by using PLA and coimmunoprecipitation experiments. Cell culture analysis in MIN6-cells showed a glucose-dependent increase in CK2 kinase activity without changes of the protein expression. The stoichiometry of CK2 in pancreatic β -cells was neither affected by insulin nor by glucose, but it was possible to show that the CK2-subunits translocate in β -cells from the cytosol into the nucleus similar than PDX-1 by stimulation with glucose. Glucose also has an influence on the binding between PDX-1 and CK2 as well as the association of both proteins in pancreatic β -cells. PDX-1 itself did not seem to have an impact on the activity of the protein kinase. Analysis concerning the PDX-1 target genes insulin, glucokinase and GLUT2 suggested a promoter-specific regulation by CK2, depending on the PDX-1 phosphorylation status. Furthermore, no influence of PDX-1 phosphorylation by CK2 on secretion of insulin via the PDX-1 target gene synaptotagmin1 could be detected. It was possible to show a glucose-dependent interaction between PDX-1 and PCIF-1 in the β -cells. The increased binding of PDX-1 and PCIF-1 by CK2 phosphorylation of PDX-1, which affects the protein stability and decreased the transactivating function of the protein, may be the key for understanding the reduction of the insulin gene transcription under hyperglycemic conditions via PDX-1. These findings about the impact of glucose on the interaction of PDX-1 and CK2 in pancreatic β -cells are summarized in figure 1.

3. Einleitung

3.1 Die Funktion des Pankreas

Das Pankreas ist ein quer im Oberbauch von Wirbeltieren liegendes Drüsenorgan, welches in der embryonalen Entwicklung des Organismus aus dem endodermalen Darmrohr in Nähe des Duodenums hervorgeht [11]. Über die Entstehung, Entwicklung und Differenzierung des Pankreas ist relativ wenig bekannt, es gibt jedoch eine Anzahl von Genen, welche für Transkriptionsfaktoren codieren, die eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Differenzierung des Organs spielen [11,23,81,96]. Somit ist die Spezifizierung der pankreatischen Zellen und Zelldifferenzierung in erster Linie abhängig vom An- und Ausschalten eines charakteristischen Gensatzes [136]. Das Überleben von Wirbeltieren erfordert sowohl eine exokrine als auch eine endokrine pankreatische Funktion [208]. Die exokrinen Zellen machen über 90% des Gesamtorgans aus und produzieren Enzyme wie Proteasen, Amylasen, Lipasen und Nukleasen, welche über die Drüsenzellen ins Duodenum gelangen und wichtig sind für die Verdauung und Absorption von Nährstoffen. Die Sekretion wird über hormonelle Stimulation, hauptsächlich über Sekretin, Cholecystokinin und Gastrin sowie durch neurale Stimuli reguliert [11]. Das endokrine Pankreas besteht aus 4 Hauptzelltypen mit individuellen Produktionsprofilen [208]. Die α -Zellen produzieren Glucagon, die β -Zellen sezernieren Insulin und die δ -Zellen sind für die Synthese von Somatostatin zuständig. Des Weiteren gibt es die pankreatischen Polypeptidzellen [11]. Die endokrinen Zellen formen einen Kern aus β -Zellen, die den größten Teil des endokrinen Pankreas ausmachen, welcher von den übrigen Zelltypen umgeben wird und den funktionellen Bereich, die sogenannte Langerhansinsel, bildet [3]. Die Aufgabe des endokrinen Pankreas besteht hauptsächlich im Erhalt der Glucosehomöostase in der Zelle durch die Fähigkeit der pankreatischen β -Zellen auf einen Glucosestimulus hin Insulin zu sezernieren, welches den Blutzuckerspiegel der Zelle senkt. Diese Glucose-stimulierte Insulinsekretion läuft in der β -Zelle des Pankreas auf die in Abbildung 2 gezeigte Art und Weise ab: Glucose gelangt über den GLUT2-Transporter (Glucose-Transporter 2) ins Cytoplasma der β -Zelle und wird im Rahmen der Glykolyse verstoffwechselt. Bei diesem Prozess spielen eine Reihe von Enzymen eine Rolle, unter anderem die Glucokinase, welche die Umwandlung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat katalysiert. Nach vollendeter Glykolyse kommt es zur Erhöhung der Relation von ATP zu ADP, was in einer Depolarisierung der Zellmembran resultiert sowie einer Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Daraufhin werden spannungsabhängige Calciumkanäle an der Membran

geöffnet, was nachfolgend zum Calciuminflux in die β -Zelle führt und die Exocytose von Insulingranula zur Folge hat [26]. Parallel dazu werden auf den Glucosestimulus hin Transkriptionsfaktoren aktiviert, die im Zellkern die Transkription des Insulins initiieren.

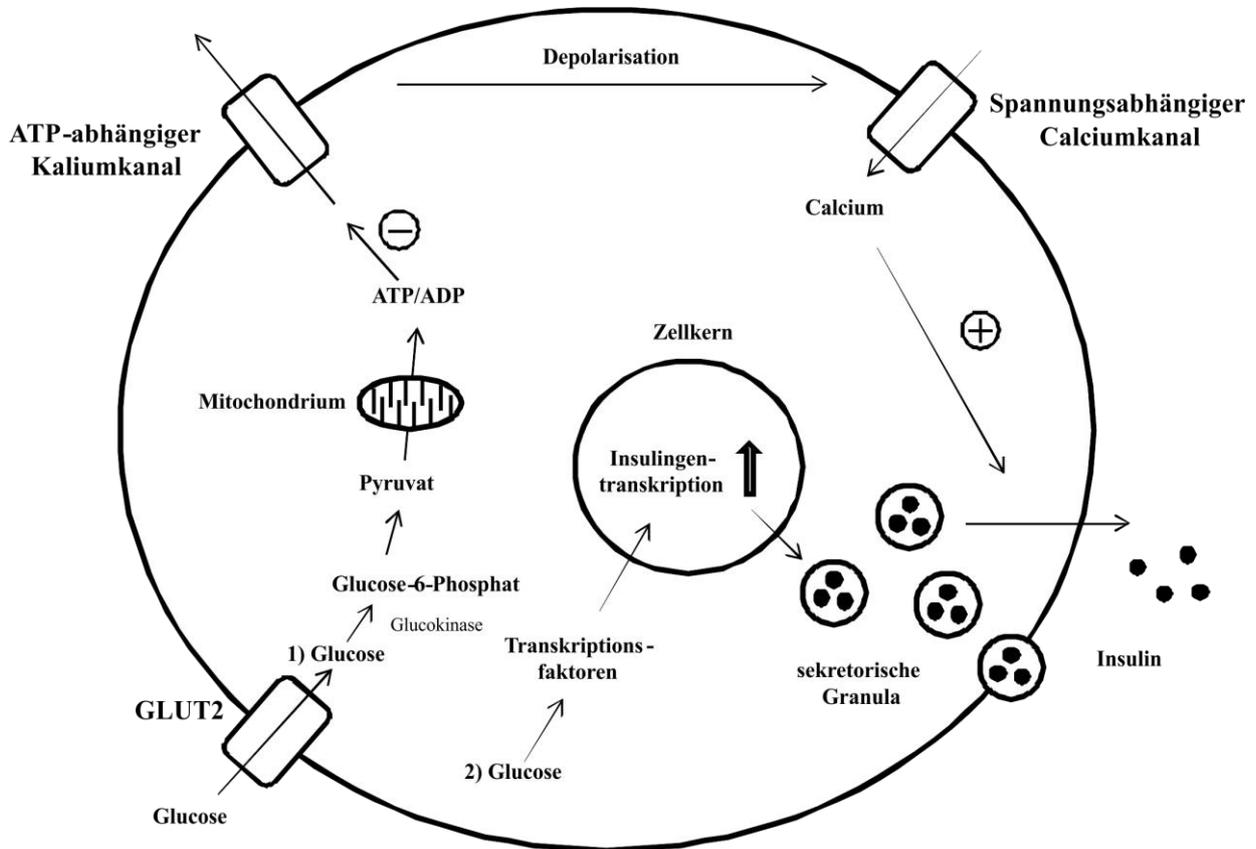


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle. Glucose wird über den GLUT2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen und im Rahmen der Glykolyse verstoffwechselt. Daraufhin werden Prozesse initiiert, die zum Öffnen von Calciumkanälen an der Zellmembran führen, was in einer Erhöhung des intrazellulären Calciumgehaltes resultiert. Auf diese Calciumerhöhung hin wird Insulin aus der Zelle freigesetzt. Zudem wird die Insulinproduktion auf Transkriptionsebene durch das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren auf den Glucosestimulus hin angeschaltet.

3.2 Der pankreatische Transkriptionsfaktor PDX-1 - Struktur und Funktion

Der korrekte Ablauf der Glucose-stimulierten Insulinsekretion ist abhängig von einem Netzwerk spezifischer Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, die koordiniert und synergistisch als Antwort auf den Glucosespiegel in der Zelle arbeiten und sich bezüglich ihrer Lokalisation und der Dauer ihrer Wirkung unterscheiden. Unter diesen Faktoren spielt PDX-1, als einer der am besten untersuchten pankreatischen Transkriptionsfaktoren, eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Organs sowie dem Funktionserhalt der pankreatischen β -

3. Einleitung

Zelle [180]. PDX-1 wurde unabhängig voneinander von verschiedenen Laboratorien entdeckt [105,142,159] und unter einer Vielzahl von Namen beschrieben: IDX-1 ("Islet and Duodenal Homeobox 1", [142]), STF-1 ("Somatostatin Transactivating Factor 1", [105]), IUF-1 ("Insulin Upstream Factor 1", [120]), PDX-1 ("Pancreatic Duodenal Homeobox-1", [158]) und GSF ("Glucose-Sensitive Factor", [127]). Vom Internationalen Komitee für standardisierte Genom-Nomenklatur wurde einheitlich die Bezeichnung des Proteins als PDX-1 ("Pancreatic Duodenal Homeobox-1") festgelegt [134]. Die vielfältige Namensgebung lässt bereits darauf schließen, dass es eine große Anzahl von Studien bezüglich der Funktion von PDX-1 gibt. PDX-1 ist das erste, im Pankreas angereicherte Genprodukt, welches während der embryonalen Organogenese in allen Zellen exprimiert wird, die sich in exokrine und endokrine Komponenten des Pankreas entwickeln [64,72,86]. Im adulten Organ ist die PDX-1-Expression auf β - und δ -Zellen des endokrinen Pankreas limitiert und kommt außerhalb des Pankreas in Zellen des Duodenums und des entwickelnden Gehirns zur Zeit der aktiven Neurogenese vor [42,166]. Die Protein- und Genstruktur von PDX-1 ist vollständig untersucht und in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Das murine PDX-1-Gen besteht aus 2 Exons, die einen Bereich von 16 kb umspannen, wobei Exon 1 für die Transaktivierungsdomäne des Proteins codiert und Exon 2 für die Homeodomäne sowie den C-Terminus [77,158,159]. Lokalisiert ist das murine PDX-1-Gen auf dem distalen Ende von Chromosom 5 [51]. Es codiert für ein Protein mit 284 Aminosäuren, wobei die Primärsequenz in verschiedenen Spezies sehr homolog ist. Die Sequenzhomologie von humanem PDX-1 zu dem der Maus beträgt 87%, wobei die Identität der Homeodomäne in Säugern 95% ausmacht [166]. PDX-1 enthält im N-Terminus eine Transaktivierungsdomäne (Aminosäuren 1-79). Eine detaillierte ortsgerichtete Mutagenese zeigt, dass die Gentransaktivierung durch 3 hochkonservierte Sequenzen vermittelt wird. Die Aminosäuren 13-22 bilden die sub-Domäne A, die sub-Domäne B besteht aus den Aminosäuren 32-38 und die Aminosäuren 60-73 sind in der sub-Domäne C zusammengefasst [169]. Diese Sequenzen sind für die Regulation der Transkription des Insulingens unter Teilnahme von Schlüsselaktivatoren wichtig [59,160]. Die mittlere Region des Proteins beinhaltet die Homeodomäne, welche für die DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktion essentiell ist. Die Polypeptidkette besitzt zudem ein Kernlokalisierungssignal (NLS) aus 7 Aminosäuren (RRMKWKK), welches in Maus, Ratte und Mensch konserviert vorliegt. Eine koordinierte Aktivität der Faktoren ist wichtig für die vollständige Differenzierung endokriner Vorläuferzellen zu Hormon-sekretierenden Zellen [191]. Im mittleren Teil des Proteins befindet sich eine Prolin-reiche-Domäne, welche an der Heterodimerisierung mit dem DNA-Bindeprotein PBX-1 ("Pre-B-cell Leukemia

3. Einleitung

Transcription Factor 1") über ein konserviertes Pentapeptid mit dem Motiv FPWMK aminoterminal zur PDX-1-Homeodomäne beteiligt ist [165]. Es wird vermutet, dass PBX-1 als Transkriptionsfaktor wichtig für die normale Entwicklung und Funktion des Pankreas [113] ist. Zudem regulieren PDX-1 und PBX-1 kooperativ im Komplex die Transkription des Somatostatin-Gens [62]. Es ist zudem möglich, dass PBX-1 im Zusammenspiel mit PDX-1 eine wichtige Rolle in der frühen Pankreasentwicklung spielt [41]. In der Homeodomäne von PDX-1 befindet sich außerdem eine "Antennapedia-like"-Domäne, auch Protein-Transduktionsdomäne genannt, welche es dem Protein ermöglicht, in Zellen einzudringen [157]. Diese Sequenz enthält auch das bereits beschriebene Kernlokalisierungssignal [71,146] sowie das Motiv KIWFQN, welches für die DNA-Bindung bedeutungsvoll zu sein scheint [118]. Die Rolle des C-Terminus ist bislang nur wenig untersucht. Es gibt Vermutungen, dass er eine inhibitorische Funktion ausübt und für die vollständige Transaktivierungsfähigkeit von PDX-1 notwendig ist [34,69]. Der C-Terminus weist eine evolutionär konservierte Region auf, welche die Interaktion mit PCIF-1 ("PDX-1 C-terminal-Interacting Factor 1), einem TRAF- ("Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor) und POZ- ("Pox Virus and Zinc Finger") Domäne enthaltenden nuklearen Faktor, ermöglicht, der das PDX-Transaktivierungspotential in spezifischer, Dosis-abhängiger Art inhibiert [3,111,112]. Der exakte Interaktionsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt und ist unter anderem ein Untersuchungsaspekt der vorliegenden Dissertation.

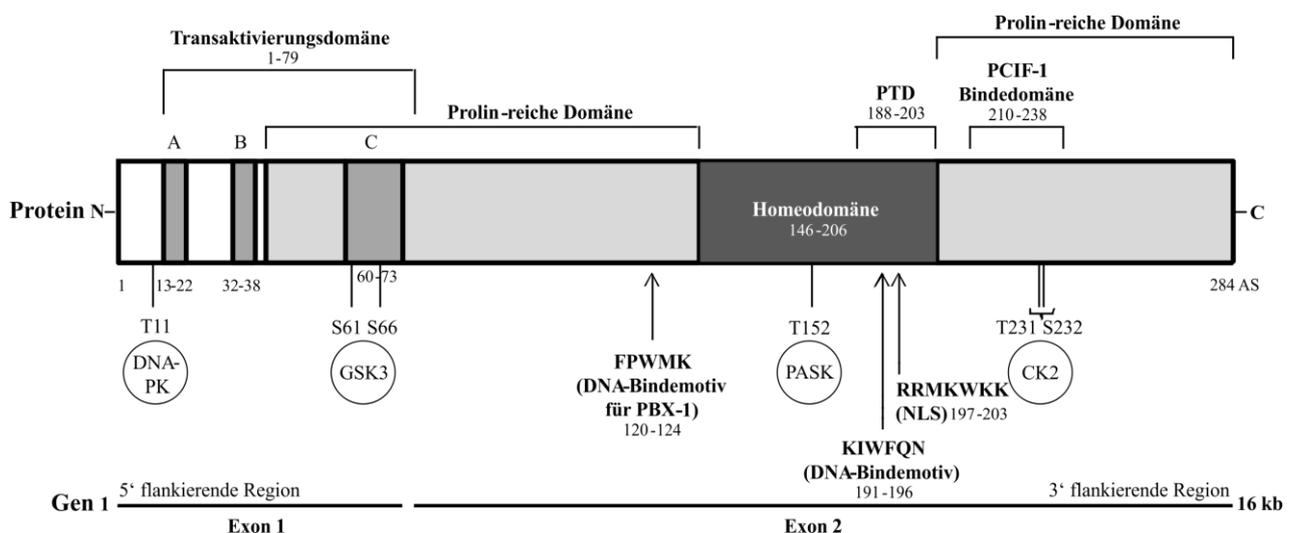


Abbildung 3: Gen- und Proteinstruktur des murinen PDX-1 mit Darstellung der funktionellen Domänen.

Das murine PDX-1-Gen besteht aus 2 Exons, die zusammen einen Bereich von 16 kb umfassen. Exon 1 codiert für die Transaktivierungsdomäne mit 3 sub-Domänen, wohingegen Exon 2 die Homeodomäne und den C-Terminus von PDX-1 mit einschließt. Zusätzlich enthält PDX-1 2 Prolin-reiche Domänen, wobei die Domäne zur 5' flankierenden Region hin ein DNA-Bindemotiv (FPWMK) für den Interaktionspartner PBX-1 aufweist.

3. Einleitung

Innerhalb der Homeodomäne befindet sich die Protein-Transduktionsdomäne (PTD), die ein weiteres DNA-Bindemotiv (KIWFQN) sowie das Kernlokalisierungssignal (RRMKWKK) des Proteins besitzt. Im C-Terminus ist eine zusätzliche Prolin-reiche-Domäne lokalisiert, welche einen Bereich für die Bindung von PDX-1 mit PCIF-1 enthält. Die Zahlen geben die Positionen der entsprechenden Aminosäuren an, die Kreise stehen für Kinasen, welche das Protein an den angegebenen Aminosäuren phosphorylieren. N: N-Terminus, C: C-Terminus, A: sub-A-Domäne, B: sub-B-Domäne, C: sub-C-Domäne, PTD: Protein-Transduktionsdomäne, NLS: Kernlokalisierungssignal, S: Serin, T: Threonin, DNA-PK: "DNA-dependent Protein Kinase", GSK3: Glycogensynthase Kinase 3, PASK: Per-Arnt-Sim Kinase, AS: Aminosäuren.

Mittels Co-Transfektionen von Reporterkonstrukten, die Promotorsequenzen enthalten, welche putative PDX-1-DNA-Bindestellen besitzen, konnte mithilfe von "Electrophoretic Mobility Shift Assays" gezeigt werden, dass PDX-1 eine Vielzahl von Genen reguliert, welche für den Erhalt der pankreatischen Zellidentität und -funktion wichtig sind, wie GLUT2 [219] und Glucokinase [223] in den β -Zellen des Pankreas sowie Somatostatin [106] in den pankreatischen δ -Zellen und dem sich entwickelnden Gehirn [190]. PDX-1 kann zudem seine eigene Expression regulieren [125]. Die wichtigste Aufgabe kommt PDX-1 jedoch im koordinierten Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie BETA2/NeuroD1 ("Beta-cell E-box Transcriptional Activator 2"/"Neurogenic Differentiation Factor 1"), Bridge-1 ("26S Proteasome non-ATPase Regulatory Subunit 9") und MafA ("V-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A") bei der Regulation der Insulinentranskription und -sekretion als Antwort auf den Blutglucosespiegel der β -Zelle auf transkriptionelle und posttranskriptionelle Weise zu [103,104,216]. Die essentielle Funktion von PDX-1 bei der Differenzierung der pankreatischen Zellen während der Embryogenese sowie für den Erhalt der Funktion des Pankreas im adulten Organismus zeigt sich anhand von Mutationsanalysen. Eine PDX-1-Null-Mutation in Mäusen resultiert in einer fehlerhaften Ausbreitung der pankreatischen Vorläufer, wodurch die Mäuse 2 bis 3 Tage nach der Geburt aufgrund von Hyperglykämie und Dehydratation sterben. Heterozygote PDX-1^{+/-} Mäuse entwickeln zwar pankreatische Vorläufer, erkranken jedoch an Diabetes mellitus, da sie eine Glucoseintoleranz aufweisen, [1,24] die mit erhöhter Inselzell-Apoptose, verminderter Inselanzahl und abnormaler Inselarchitektur einhergeht [83]. Eine verstärkte Expression von PDX-1 als Resultat von Hyperglykämie oder erhöhter Lipidkonzentration scheint ebenfalls mit Diabetes mellitus assoziiert zu sein [137,178,184]. Somit ist die richtige Gendosis von PDX-1 wichtig für eine normale Glucosehomöostase. Die Tatsache, dass Mutationen und Fehlfunktionen im humanen PDX-1-Gen unweigerlich mit einer gestörten Glucosehomöostase einhergehen, lässt darauf schließen, dass es auch im Menschen einen Zusammenhang von PDX-1 mit Erkrankungen des Pankreas geben muss. Als

3. Einleitung

Haupterkrankung des Pankreas ist eindeutig Diabetes mellitus zu nennen. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe metabolischer Fehlfunktionen, charakterisiert durch Hyperglykämie, die unbehandelt zu verschiedenen Funktionsstörungen wie Blindheit, Dysfunktion von Nieren und peripherem Nervensystem, Verlust von Gliedmaßen sowie verminderter Lebenserwartung führt. Über 150 Millionen Menschen sind weltweit von Diabetes mellitus betroffen, eine Verdopplung dieser Zahl bis zum Jahr 2025 wird vermutet [11]. Typ 1 Diabetes mellitus, auch Insulin-abhängiger Diabetes genannt, resultiert aus einer autoimmunologischen Zerstörung der β -Zellen und macht circa 5-10% der Diabetesfälle aus [11]. Weil vor allem junge Menschen von dieser Krankheit betroffen sind, ist sie auch unter dem Namen "juvener Diabetes" bekannt [3]. Im Gegensatz dazu ist die nicht Insulin-abhängige Form von Diabetes mellitus, Typ 2 Diabetes, die häufigste Form der diabetischen Erkrankungen (90% der Fälle) und betrifft circa 10-20% der Menschen älter als 45 Jahre in vielen hochentwickelten Industrieländern der westlichen Welt. Typ 2 Diabetes mellitus ist charakterisiert durch verschiedene Stadien von Insulinresistenz und β -Zell Dysfunktion, was in einer Störung der Glucose-induzierten Insulinsekretion und somit in einer Hyperglykämie resultiert. Es gibt eine Vielzahl an molekularen Ereignissen, die vermutlich mit der Entstehung von Diabetes assoziiert sind, wie Einzelgen-Fehlfunktionen, welche in einer gestörten Funktion der Insulinsekretion von β -Zellen resultieren, sowie die Befähigung von Muskel-, Fett- und Leberzellen auf Insulin zu reagieren [11]. Die duale Rolle von humanem PDX-1 in der Regulation der Pankreasentwicklung und der Transkription von β -Zell Genen sowie seine potentielle Rolle in β -Zell Neogenese identifiziert PDX-1 als einen wesentlichen Kandidaten für die Entstehung von Diabetes [208]. In der Tat wurde experimentell eine verminderte PDX-1-Expression in der Maus *in vitro* [162,196] und *in vivo* als Antwort auf eine chronische Hyperglykämie [233] wahrgenommen. Mutationen im murinen PDX-1-Gen führen zu einer Verminderung der PDX-1-Bindungsaktivität, was mit reduzierter Insulingentranskription als Antwort auf eine vorliegende Hyperglykämie einhergeht [11]. Neben diesen Erkrankungen ist MODY ("Maturity Onset Diabetes of the Young") als weitere pankreatische Fehlfunktion zu nennen. Dabei handelt es sich um eine monogenetische Form von Typ 2 Diabetes mellitus, charakterisiert durch frühen Krankheitsausbruch und autosomal dominanter Vererbung [17,47,66], welche einen Defekt in der Insulinsekretion aufweist. Es konnte nachgewiesen werden, dass für diese in 5 Typen unterteilte Erkrankung (MODY1-5) Mutationen in Genen verantwortlich sind, welche eine Schlüsselrolle für die korrekte Funktion der β -Zelle besitzen. Eine PDX-1-Fehlfunktion, verursacht durch eine homozygote Einzelnukleotid-Mutation im humanen PDX-1-Gen (Codon 63), resultiert in einem

Ausbleiben der Pankreasentwicklung des Menschen, was sich nach Geburt als letal erweist [209]. Familienmitglieder, die heterozygote Träger dieser Mutation sind, entwickeln MODY4 [197,209]. Als weitere pankreatische Krankheit ist das Pankreaskarzinom zu erwähnen, welches laut einer Studie die fünfthäufigste Ursache für den Tod infolge einer Krebserkrankung in den Vereinigten Staaten von Amerika darstellt. Diese Krebsart ist eine der wenigen, bei denen die Inzidenz mit Mortalität gleichzusetzen ist [58]. Man geht davon aus, dass verschiedene Arten von Genmodifikationen, wie die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren, die häufigste Ursache für die Entstehung von Pankreaskarzinomen ist [11]. Neueste Daten zeigen, dass pankreatische Krebszellen eine signifikant erhöhte Menge an PDX-1 aufweisen [11]. Die uneingeschränkte Funktion des pankreatischen Transkriptionsfaktors PDX-1 ist somit unerlässlich für eine korrekte Entwicklung und Differenzierung des Pankreas sowie für den Erhalt und die Funktion des Organs [8].

3.3 Die Proteinkinase CK2

Wie am Beispiel von PDX-1 gezeigt, gilt die Phosphorylierung als eine der Hauptregulationsmechanismen von Proteinen. Proteinphosphorylierungen sind an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt, wie die Koordination metabolischer Stoffwechselwege, die Regulation von Signalkaskaden, sowie Replikation, Transkription und Translation von DNA und haben einen Einfluss auf die Struktur von Proteinen. Die Proteinkinase CK2 gehört zu einer der ersten identifizierten Kinasen überhaupt [4]. Sie wurde 1954 von Burnett und Kennedy entdeckt und war lange Zeit unter dem Namen Caseinkinase 2 bekannt [147]. Die CK2 ist ein ubiquitäres, in der Evolution hochkonserviertes tetrameres Enzym, bestehend aus 2 katalytischen CK2 α - (44 kDa) bzw. CK2 α' - (36 kDa) und 2 nicht katalytischen CK2 β -Untereinheiten, wobei CK2 α oder CK2 α' an ein Dimer aus CK2 β binden und dadurch das CK2-Holoenzym bilden. Obwohl CK2 α und CK2 α' von 2 unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen codiert werden, zeigt ihre Aminosäuresequenz im N-Terminus 90%-Identität, im C-terminalen Bereich unterscheiden sich die Proteine jedoch deutlich [117,148]. Verschiedene Studien zeigen, dass neben dem CK2-Holoenzym auch die einzelnen Untereinheiten der CK2 individuelle Funktionen besitzen können [65,116,176,205,231]. Neuesten Untersuchungen zufolge treten auch katalytisch aktive Oligomerisationen zu Trimeren, Tetrameren oder höher-oligomeren Formen der CK2 auf [115,217]. Durch Experimente mit Hefen und Mäusen konnte festgestellt werden, dass ein Verlust von CK2 α oder CK2 β letal ist [75,116]. CK2 α' Knockout-Mäuse sind zwar lebensfähig, die männlichen

Nagetiere sind jedoch unfruchtbar [45,60,75,116,183,231]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es unterschiedliche Funktionen von CK2 α und CK2 α' geben muss [148]. Die CK2 erkennt Serine und Threonine in saurer Aminosäureumgebung. Laut *in silico*-Analysen können mehr als 1000 Proteine, die über das für die CK2 charakteristische Konsensusmotiv S/TXXE/D verfügen, von der CK2 phosphoryliert werden. Tatsächlich sind bereits mehr als 400 Substrate der Proteinkinase in Cytosol, Nukleus und Zellmembranen experimentell bestätigt [19,135,175]. Die CK2 kann sowohl ATP als auch GTP effizient als Phosphatdonor nutzen. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens kann die CK2 mit einer Vielzahl zellulärer Prozesse in Zusammenhang gebracht werden [147]. Eine zentrale Rolle der CK2 konnte bereits in der Regulation der Genexpression, Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese sowie Seneszenz zugeschrieben werden [139,139,147,147,148,148]. Außerdem scheint es einen Zusammenhang zwischen der CK2 und der Entstehung verschiedener Krebsarten zu geben, da eine erhöhte Expression des Proteins sowie seiner Aktivität in Karzinomen von Brust [53], Prostata [101], Niere [205], Darm [110], Lunge [38] sowie Kopf-Hals-Karzinomen [213] gefunden wurde. Diese Beobachtungen scheinen mit der anti-apoptotischen Wirkung des Proteins in Tumorzellen einherzugehen [2,200,221].

3.4 Die CK2 und der Kohlenhydratstoffwechsel

Der Kohlenhydratstoffwechsel ist ein Prozess, welcher dem Transport, der Aufnahme sowie dem Abbau von Kohlenhydraten dient. Glucose steht dabei als Hauptenergieträger der Zelle im Vordergrund dieses Stoffwechsels. Die engmaschige Kontrolle der Abläufe, die mit der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten einhergeht, ist ein essentieller Punkt für Wachstum und Überleben der Zellen und des Organismus [4]. Die Proteinkinase CK2 wurde erstmals bei Analysen des Kohlenhydratstoffwechsels identifiziert [4]. Nachdem bereits erhöhte Kinaseaktivitäten der CK2 in Gehirn, Leber und Skelettmuskel gefunden wurden, also Organen und Gewebe, die für den Kohlenhydratstoffwechsel notwendig sind, ist es verwunderlich, dass bislang nur wenige CK2-Substrate im Kohlenhydratstoffwechsel identifiziert werden konnten [80,130,230]. Die bereits bekannte Rolle der CK2 im Kohlenhydratmetabolismus besteht sowohl in hormoneller Regulation als auch im direkten Einfluss auf Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels [4]. Ein Beispiel für die Funktion der CK2 bezüglich der hormonellen Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels ist die Phosphorylierung des Insulinrezeptors durch CK2, welcher eine extrazelluläre Hormonbindestelle, sowie eine intrazelluläre Domäne mit Insulin-stimulierter Tyrosinkinaseaktivität besitzt [13,63]. Diese CK2-Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten in der

intrazellulären, aktivierenden Domäne des Insulinrezeptors verursacht Grande *et al.* zufolge eine Reduzierung der Aktivität der Tyrosinkinase [63,123]. Des Weiteren wird das "Insulin Receptor Substrate 1" (IRS1), ein Zielprotein des Insulinrezeptors, ebenfalls Insulin-abhängig von der CK2 phosphoryliert [211]. Außer diesen Funktionen der CK2 bezüglich der Insulin-signalkaskade konnte auch eine Regulation von Enzymen im Kohlenhydratstoffwechsel nachgewiesen werden. Die Glykogensynthase, ein Enzym, das bei der Speicherung von Glucose in der Zelle wichtig ist, konnte als Substrat der CK2 erkannt werden [211]. Die Phosphoglucose-Isomerase, die in der Glycolyse für die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat verantwortlich ist, wird an der Aminosäure Serin 185 von der CK2 phosphoryliert [67] und der Transkriptionsfaktor SP1, der bei der Expression der Acetyl-CoA Carboxylase eine Rolle spielt, wodurch die Glucose-stimulierte Insulinsekretion beeinflusst wird, sind als weitere Beispiele zu nennen [179,236]. Somit ist die Teilnahme der CK2 im Kohlenhydratstoffwechsel bereits bestätigt, es gilt jedoch in Zukunft weitere Substrate der Kinase im Stoffwechsel zu identifizieren, um die regulatorischen Funktionen der komplexen Abläufe zu erforschen und gegebenenfalls neue Ziele zur Therapie von Stoffwechselerkrankungen zu erkennen.

3.5 PDX-1 und CK2

Die Regulation der Funktion von PDX-1 bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion wird weitestgehend über posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Sumoylierung vermittelt, wobei die Phosphorylierung als Hauptregulationsmechanismus gilt [11]. Es ist bekannt, dass PDX-1 von einer Vielzahl von Kinasen phosphoryliert wird, wodurch Translokationsänderungen, DNA-Bindung und das Transaktivierungspotential des Proteins geregelt werden [3]. Unter den bekannten Kinasen, die PDX-1 phosphorylieren, sind die Per-Arnt-Sim Kinase, die PDX-1 an der Aminosäure Threonin 152 phosphoryliert [6], die Glycogensynthase Kinase 3, mit den Phosphorylierungsstellen Serin 61 und Serin 66 von PDX-1 [11,22,114] sowie die "DNA-dependent Protein Kinase" an der Aminosäure Threonin 11 des Proteins als Beispiele zu nennen [102] (Abbildung 3). Detaillierte Analysen der PDX-1-Modifikationen lassen darauf schließen, dass die posttranslationalen Veränderungen von PDX-1 zur Regulation der vielfältigen Funktionen des Proteins entscheidend beitragen [22,92,95,114,119,122,149-151,199,206,229]. In einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde PDX-1 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh erstmals als möglicher Bindungspartner der Proteinkinase CK2 identifiziert, die als ubiquitär vorkommendes Enzym mit mehr als 400 Substraten eine weitgreifende regulatorische Funktion im Organismus innehat [135]. Da in

3. Einleitung

der Literatur keine Daten über eine Interaktion von PDX-1 und CK2, sowie deren Auswirkungen auf die Regulation pankreatischer β -Zellen bekannt war, wurde diese im Rahmen einer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh aus dem Jahr 2010 in *in vivo*- und *in vitro*-Studien näher untersucht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei PDX-1 um ein Substrat der CK2 handelt, war es nach Herstellung von Peptidfragmenten und ortsgerichteter Mutagenese möglich, 2 CK2-Phosphorylierungsstellen von PDX-1 im C-terminalen Bereich des Proteins zu identifizieren (Threonin an Position 231 und Serin an Stelle 232) [139] (Abbildung 3). Rui Meng aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh konnte nachweisen, dass PDX-1 unabhängig von der CK2-Phosphorylierung sowohl an das CK2-Holoenzym als auch an die einzelnen CK2-Untereinheiten bindet. Diese Bindungsstudien beruhen jedoch hauptsächlich auf Untersuchungen mit transfizierten PDX-1-Konstrukten in nicht pankreatischen Zellsystemen oder auf *in vitro*-Studien mit "getaggten" Proteinen, weshalb sie nicht für die physiologische Bedeutung der Interaktion von PDX-1 und CK2 herangezogen werden können. Des Weiteren wurden Analysen zur Bedeutung der CK2-Phosphorylierung für die Funktionalität von PDX-1 angestellt. Als Resultate konnten eine Verminderung der CK2-Phosphorylierung von PDX-1 sowie eine Reduktion der durch PDX-1 im Zusammenspiel mit weiteren Cofaktoren initiierten Insulingentranskription nach 24 Stunden festgehalten werden [138,139]. Der Einfluss der PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Insulingentranskription muss zukünftig in einem detaillierten Zeitverlauf untersucht werden, um maximale Aktivitätspeaks der Transkription des Insulins unter CK2-Einfluss zu ermitteln. Neben Insulin gibt es zudem eine Vielzahl weiterer PDX-1-Zielgene [159,219,223], welche in ähnlicher Weise durch die CK2-Phosphorylierung des Proteins beeinflusst werden könnten. Rui Meng konnte nachweisen, dass PDX-1 nach Phosphorylierung durch die CK2 destabilisiert und proteasomal abgebaut wird [138]. Es wäre wichtig zu analysieren über welche Interaktionspartner von PDX-1 die durch CK2 hervorgerufene Destabilisierung des Proteins vollzogen wird. Außerdem wurden Experimente durchgeführt, welche vermuten lassen, dass durch CK2 eine negative Rückkopplungshemmung der PDX-1-abhängigen Insulinsekretion in Pankreaszellen induziert wird [140]. Die genaue Rolle der CK2 bei der Insulinsekretion in den pankreatischen β -Zellen bleibt jedoch offen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit aus dem Jahr 2011 wurden die bislang von Rui Meng erhaltenen Daten betreffend einer Interaktion von PDX-1 und CK2 ergänzt. Ich konnte zum einen bestätigen, dass PDX-1 nach Glucosekarenz im Cytoplasma von β -Zellen lokalisiert ist und nach Glucosestimulation in den Zellkern transloziert und zum anderen erstmals zeigen, dass die CK2 eine ähnliche Translokationsänderung wie PDX-1 vollzieht. Alle 3

Untereinheiten der CK2 sind nach Glucoseentzug ubiquitär oder rein cytoplasmatisch vorzufinden. Nach Zugabe von Glucose kommt es, ähnlich wie bei PDX-1, zu einer Zeit- und Glucosekonzentrations-abhängigen Translokation der CK2-Untereinheiten in den Kern der pankreatischen β -Zellen, wobei die CK2 nach Translokation im Zellkern mit PDX-1 colokalisiert vorliegt [226]. Die Wanderung der CK2 vom Cytoplasma in den Zellkern ist unabhängig von PDX-1. Untersuchungen mit einer nicht durch die CK2 phosphorylierbaren PDX-1-Mutanten, sowie dem CK2-Hemmstoff TBB zeigen, dass die Glucose-induzierte Translokation von PDX-1 unabhängig von der CK2-Phosphorylierung des Proteins ist. In HEK293-Zellen war nach Transfektion von PDX-1 eine Bindung von CK2 α und CK2 α' an das Protein mittels Coimmunpräzipitationsanalysen nachweisbar. Die physiologische Bedeutung der Bindung von PDX-1 und CK2 in pankreatischen β -Zellen konnte bislang nicht geklärt werden. Zudem wurden erste Experimente zur Aufklärung der Rolle der CK2 bei der Regulation der PDX-1-Zielgene Glucokinase und GLUT2 mittels Reporterassay-Studien durchgeführt, die darauf hindeuten, dass die CK2 an deren Regulation beteiligt ist und somit bei der Glucosehomöostase eine wichtige Rolle spielen könnte [225]. Auch hier müssen zur Analyse der Bedeutung der CK2-Phosphorylierung auf die PDX-1-Zielgene noch detailliertere Untersuchungen durchgeführt werden.

3.6 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher erhaltenen Resultate bezüglich der Funktion einer Interaktion von PDX-1 und CK2 wirft eine Reihe offener Fragen auf. In der vorliegenden Dissertation wird die Wechselwirkung zwischen PDX-1 und CK2 auf molekularer Ebene bei Prozessen, die im Rahmen der Glucose-stimulierten Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas ablaufen, näher analysiert. Vor allem der Einfluss von Glucose als zentraler Stimulus der Insulingentranskription und -sekretion wird in Bezug auf die PDX-1/CK2-Interaktion untersucht. Die biologische Bedeutung der beiden Proteine sowie deren Wechselwirkung im primären Mausmodell wird betrachtet, um nachfolgend die Interaktion auf molekularer Ebene im Zellkultur-Modell pankreatischer β -Zellen genauer zu charakterisieren. Neben einem potentiellen Einfluss von Glucose auf die Expression der beiden Proteine wird auch die Aktivität der CK2 auf diesen physiologischen Stimulus hin analysiert, um zu testen, ob eine Glucoseabhängigkeit der Interaktion von PDX-1 und CK2 vorliegt. Durch Analysen der Auswirkung einer PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die PDX-1-Zielgene Insulin, Glucokinase und GLUT2, die zu den Hauptregulatoren der Glucose-stimulierten Insulinsekretion gehören, werden in detaillierten Reporterassay-Studien weitere potentielle

3. Einleitung

Funktionen der CK2 im Kohlenhydratstoffwechsel untersucht. Neben dem beschriebenen Effekt der CK2 auf die Insulinentranskription dient der ebenfalls mögliche Einfluss der CK2 auf die Sekretion des Hormons als weiterer Analysepunkt. PCIF-1, ein Interaktionspartner von PDX-1 im C-Terminus, der die Stabilität und Transaktivierung des Proteins beeinflusst, bindet im Bereich der CK2-Phosphorylierungsstellen. Aus diesem Grund wird geklärt, inwieweit sich eine PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 auswirkt. Zusammenfassend sollen die beschriebenen Experimente dazu dienen, weitere Aspekte in der komplexen Regulation der β -Zell Funktion aufzudecken.

4. Materialien

4.1 Geräte, Chemikalien und Enzyme

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

1.7 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
15 ml/50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
6 /24-Loch Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
96-Loch Platten weiß Nunc [®]	Sigma-Aldrich, München
100-mm/60-mm Kulturschalen	Greiner, Nürtingen
Autoklav Varioklav [®] 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman, München
Brutschrank 6000 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Inc., Hanau
Corex [®] -Röhrchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dako "Magic Pen"	Dako Dänemark A/S, Glostrup
Dampfsterilisator Varioklav 500	H+P Labortechnik GmbH, München
Deckgläschen, Durchmesser 12 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Own Systems P9DS	Systems, Inc., Portsmouth
Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small	Hoefer Inc., Holliston
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Glasplatten für Elektrophorese	Hoefer Inc., Holliston
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Filterspitzen (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl 10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Hamilton MICROLITER Spritze	Hamilton, Bonaduz
Heizblock	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Infinite M200 Pro TECAN Reader	Sigma-Aldrich, München
Inkubator	Heraeus Inc., Hanau
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	Sigma-Aldrich, München
Labor-Glasware	Schott, Mainz
Light Cycler [®]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler [®] Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler [®] Centrifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

4. Materialien

Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Milli-Q Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Millipore, Schwalbach/Ts
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nucleobond [®] -Säulen	Macherey Nagel, Düren
P81 Ionenaustausch-Filterpapier	Whatman, Kent
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
PCR Reader (Mastercycler Gradient)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Petrischalen 94 mm	Greiner, Nürtingen
pH-Meter, pH537	WTW, Weilheim
Phosphor Imager Typhoon 9410	GE Healthcare, München
Phosphor Imaging-Platten (Storage Phosphor Screen)	Amersham Biosciences, München
Pipetten (1000 µl, 200 µl)	Gilson, Villiers le Bel
Pipette (20 µl)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Pipette (10 µl)	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl 10 µl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Powergeräte	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
Röntgenfilm (AGFA Cronex 5)	AGFA-Gevaert, Belgien
Röntgenfilmentwicklermaschine	AGFA-Gevaert, Belgien
Sterilbank LaminAir [®] HBB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Szintillationsanalysator 190S AB/LA	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer IKA [®] RCTbasic	IKA [®] GmbH und Co. KG, Staufen
Thermoschüttler CertoMat [®] H	Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Ultraschallbad Transonic 460	Elma GmbH, Singen/Htw
Universal Hood II-System	BioRad, München
UV-Quarzküvette 10 mm	Hellma, Müllheim

4. Materialien

UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro Vortex Genie 2™	Amersham Bioscience, München Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL Laborgeräte, Burgwedel
Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
BioRad Protein Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie-Brilliant-Blue G250 und R250	Boehringer, Ingelheim
CX-4945	Selleckchem, Houston
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
DMEM-Medium	Sigma-Aldrich, München
DMEM-Medium ohne Glucose	Biochrom KG, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, München
Duolink® <i>In Situ</i> Mounting Medium mit DAPI	Sigma-Aldrich, München
Duolink® <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Kaninchen PLUS	Sigma-Aldrich, München
Duolink® <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Mouse MINUS	Sigma-Aldrich, München
ECL Lumilight System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Pharmacia Biotech, Schweden
Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
FCS	Gibco BRL, München
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt

4. Materialien

GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Glutathion	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Kaninchen-Serum zum Blocken	Dianova, Hamburg
LB-Both-Medium	Sigma-Aldrich, München
Luciferase-Reagenz	Promega GmbH, Mannheim
Lysepuffer (cell culture lysis 5 x)	Promega GmbH, Mannheim
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences AB, Uppsala
Quinalizarin	Labotest OHG, Niederschöna
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Österreich
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
TBB	Calbiochem Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin	MP Biomedicals, Heidelberg
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Trizol Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypanblau	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Trypsin	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Turbofect® Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Verschiedene gewöhnliche Laborchemikalien	Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Steinheim, Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fischer, Saarbrücken

4.1.3 Radiochemikalien

[³² P]-γ-ATP (10 μCi/μl)	Hartmann Analytic, Braunschweig
--------------------------------------	---------------------------------

4.1.4 Enzyme

CK2-Holoenzym	Arbeitsgruppe von Prof. Dr.Montenarh, Universität des Saarlandes
CK2 α	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh, Universität des Saarlandes
RNaseOUT™ RNase-Inhibitor	Invitrogen™, Darmstadt
RNase A	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
SuperScript™ II RNase H- Reverse Transkriptase	Invitrogen™, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Trypsin	Biochrom KH, Berlin

4.1.5 Experimentelle Kits

Duolink® <i>InSitu</i> PLA Detection Reagents Red	Sigma-Aldrich, München
ELISA-Kit Rat/Mouse Insulin	Merck KGaA, Darmstadt
Luciferase-Assay Kit	Promega GmbH, Mannheim
Nucleobond® PC 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Turbofect® Transfektions-Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuickPrep micro mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences, München

4.2 Nährmedien für Bakterien

Für die Herstellung von LB-Broth-Medium werden 1% Bacto-Trypton, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, sowie 1% NaCl, pH 7.0 in H₂O deion. gelöst und anschließend autoklaviert. Aus einem Liter LB-Broth-Flüssigmedium wird nach Zugabe von 2% Bacto-Agar und anschließendem Autoklavieren LB-Broth-Agar hergestellt, welcher nach Erhitzen zur Selektion mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 50 µg/ml und Tetracyclin 12.5 µg/ml) versehen und in 100-mm Kulturschalen gefüllt wird.

4.3 Molekulargewichtsmarker

4.3.1 DNA-Molekulargewichtsmarker

Zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente wird der "GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder" eingesetzt, welcher 14 diskrete Fragmente innerhalb von 250 bp bis 10.000 bp Größe enthält. Für die Agarosegel-Analyse werden 5 µl dieses Markers mit einer Konzentration von 0.5 µg/µl eingesetzt.

4.3.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ ist ein Proteinstandard mit 6 Proteinen, die ein Molekulargewicht von 20 bis 120 kDa abdecken (120 kDa: β -Galaktosidase (*E. coli*); 85 kDa: Rinderserumalbumin (Rinderplasma); 50 kDa: Ovalbumin (Hühnereiweiß); 35 kDa: Carboanhydrase (Rindererythrocyten); 25 kDa: β -Lactoglobulin (Rindermilch); 20 kDa: Lysozym (Hühnereiweiß)). Der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ ist zur Darstellung der Proteinauftrennung während der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Verifizierung der Western Blot Transfereffizienz auf PVDF, Nylon- und Nitrocellulosemembranen und zur Abschätzung der Proteingröße geeignet. Alle Proteine des Markers sind kovalent an einen blauen Chromophor gekoppelt [215]. Neben dem „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ gibt es noch zusätzlich den "Unstained Protein Molecular Weight Marker", der 7 Proteine mit Molekulargewichten von 14.4 bis 116 kDa umspannt (116 kDa: β -Galactosidase; 66.2 kDa: Rinderserumalbumin; 45 kDa: Ovalbumin; 35 kDa: Lactatdehydrogenase; 25 kDa: REase Bsp98I; 18.4 kDa: β -Lactoglobulin; 14.4 kDa: Lysozyme. Dieser Proteinstandard kann durch die Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden.

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Typ
α -Tubulin	Polyklonaler Maus-Antikörper (clone DM1A, Sigma-Aldrich, München), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung: 1:1.000 (Western Blot)
CK2 α -Peptid	Kaninchen-Antiserum #26 (AS 360-371, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [48]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz) Monoklonaler Maus-Antikörper 1A5 (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [189]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:200 (Western Blot)
CK2 α' -Peptid	Kaninchen-Antiserum #30 (AS 330-349, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [48]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)
CK2 β -Peptid	Kaninchen-Antiserum #32 (AS 119-129, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [48]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz) Monoklonaler Maus-Antikörper 6D5 (AS 119-129, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [189]), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:50 (Western Blot)
FLAG	Monoklonaler Maus-Antikörper (Anti-FLAG M2, Sigma-Aldrich, München), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:2.000 (Western Blot), 1:400 (Immunfluoreszenz)
Glucagon	Monoklonaler Maus-Antikörper (Abcam, Berlin), Verdünnung 1:1.000 (Immunfluoreszenz)
Insulin	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:50 (Immunfluoreszenz)

4. Materialien

PCIF-1	<p>Polyklonaler Ziege-Antikörper (SPOP K-13, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Verdünnung 1:50 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Monoklonaler Maus-Antikörper (SPOP B-8, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:500 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)</p>
PDX-1	<p>Polyklonales Kaninchen-Antiserum (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh), gelöst in PBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Monoklonaler Maus-Antikörper (clone 267712 R&D Systems, Wiesbaden), gelöst in TBS mit 1% (v/v) Tween 20, Verdünnung 1:1.000 (Western Blot), 1:100 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper (Abcam, Berlin), Verdünnung 1:200 (Immunfluoreszenz)</p>
Somatostatin	<p>Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (#28, Abcam, Berlin), Verdünnung 1:500 (Immunfluoreszenz)</p>

4.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Typ
Kaninchen IgG	<p>Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Dianova Hamburg), Verdünnung 1:30.000 (Western Blot)</p> <p>Alexa-FluorTM594-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Molecular Probes, Darmstadt), Verdünnung 1:1.000 (Immunfluoreszenz)</p> <p>Cy3-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Dianova, Hamburg), Verdünnung 1:400 (Immunfluoreszenz)</p>

4. Materialien

Maus IgG	<p>Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Dianova, Hamburg), Verdünnung 1:10.000 (Western Blot)</p> <p>Alexa-Fluor™488-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Molecular Probes, Darmstadt), Verdünnung 1:500 (Immunfluoreszenz)</p>
Meerschweinchen IgG	Alexa-Fluor™488-konjugierter Antikörper (aus Ziege, Invitrogen™, Darmstadt), Verdünnung 1:200 (Immunfluoreszenz)
Ziegen IgG	<p>Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Kaninchen, Dianova Hamburg), Verdünnung 1:10.000 (Western Blot)</p> <p>Alexa-Fluor™488-konjugierter Antikörper (aus Esel, Life Technologies, Darmstadt), Verdünnung 1:500 (Immunfluoreszenz)</p>

4.5 Bakterienstämme

Escherichia coli XLI blue: Der Bakterienstamm besitzt eine Tetracyclinresistenz und wird zur Plasmidamplifikation verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* {F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^R)}

Quelle: Stratagene, Waldbronn

4.6 Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle
MIN6	Maus Insulinoma-Zellen, Glucose-responsiv, Passagen < 60	Prof. Dr. Gerald Thiel, Homburg
β-TC3	Maus Insulinoma-Zellen, nicht Glucose-responsiv	Prof. Dr. Gerald Thiel, Homburg

4.7 Primer

Tabelle 4: Verwendete murine Primer

Bezeichnung	Sequenz von 5' zu 3'	Orientierung	T _m
komparative PCR β-Actin	GAG GAG CAC CCC GTG CTG CTG CTG A	3'	56°C
komparative PCR β-Actin	CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG GCC	5'	56°C
komparative PCR Syt1	AAA GAC TTT GCC GAT GGC GTC GTT	3'	52°C
komparative PCR Syt1	ATG GCT GTG TAT GAT TTT GAC CGC T	5'	52°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR CK2α	GAT GGC TTC AAA CAC TTC ACT G	3'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR CK2α	AGG GCC AGA GTT TAC ACA GAT	5'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR CK2β	AAA GTC TCC CTG CTG GTA CT	3'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR CK2β	GGT GCC TCA CTA TCG ACA AG	5'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR GAPDH	CAC GAC GTA CTC AGC GCC	3'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR GAPDH	GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC	5'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR PDX-1	GGT CAT GAG CCC TTC CAC AAT	3'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR PDX-1	AGA AGC TGG CCA CTA GCC TCT	5'	57°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR Syt1	CAT CAC CAG TGT CTT GCC ACC T	3'	54°C
qRT- <i>Real time</i> -PCR Syt1	CTG AGC CAG CCA GTC CTG GG	5'	54°C

4.8 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Marke r	Details	Quelle
pcDNA3.1/hygro(-) PDX-1-Wildtyp	<i>AMP</i>	Maus Volllängen PDX-1 cDNA (855 bp)	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [139]
pcDNA3.1/hygro(-) PDX-1 _{T231A/S232A}	<i>AMP</i>	Maus Volllängen PDX-1 cDNA (855 bp) mit Austausch von ACC an Position 691 durch GCC, sowie TCG an Position 694 mit GCG (auf Proteinebene: T231A und S232A)	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [139]
p3xFLAG/CMV-7.1 CK2 α	<i>AMP</i>	Humane CK2 α cDNA (1176 bp)	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh [139]
p3xFLAG/CMV-7.1 CK2 β	<i>AMP</i>	Humane CK2 β cDNA	Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh
p3xFLAG/CMV-2 PCIF-1 (SPOP) WT	<i>AMP</i>	Humane Volllängen PCIF-1 cDNA (1124 bp)	Prof. Dr. Chung, Seoul
pGEM3ZFM- RIP1-POLYA (Insulinpromotor)	<i>AMP</i>	Ratten Insulinpromotor 1 (RIP 1) nt -410/+ 51	Prof. Dr. M-J. Boucher [22]
pGL3-Basic -GK-1448-Luc (Glucokinasepromotor)	<i>AMP</i>	Ratten Glucokinasepromotor, pankreasspezifisch nt -990/+14	Prof. Dr. Thomas Kietzmann, Oulu
pGL3-rat-GLUT2-Luc (GLUT2-Promotor)	<i>AMP</i>	Ratten GLUT2-Promotor	Prof. Dr. Gerald Thiel, Homburg

4.9 Gereinigte, rekombinante Proteine

Tabelle 6: Verwendete rekombinante Plasmide

Name	Details
Nucleolin p100	Humanes Nucleolin (100 kDa) [192]
pGEX-4T-1-C/EBP δ	Humane CCAAT/Enhancer-binding Protein Delta cDNA (810 bp)
pGEX-4T-1-PDX-1-Wildtyp	Maus Vollängen PDX-1 cDNA (855 bp)
pGEX-4T-1-PDX-1 _{T231A/S232A}	Maus Vollängen PDX-1 cDNA (855 bp) mit Austausch von ACC an Position 691 durch GCC, sowie TCG an Position 694 mit GCG (auf Proteinebene: T231A und S232A)

4.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Puffer für Agarose Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer (6 x)	80 % 2 x TAE-Puffer 20% Glycerol 0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF Lagerung bei Raumtemperatur
TAE-Puffer (10 x), pH 7.2	400 mM Tris-Acetat 200 mM Na-Acetat 10 mM Na ₃ -EDTA gelöst in H ₂ O deion., autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur

4. Materialien

Tabelle 8: Antibiotika und Puffer für Bakterien

Ampicillin	50 mg/ml gelöst in 1 ml H ₂ O deion., sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
LB-Broth-Agarplatten, pH 7.3	2% Bacto-Agar 1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O deion., autoklaviert bei Gebrauch mit entsprechenden Antibiotika versehen (50 µg/ml Ampicillin, 12.5 µg/ml Tetracyclin), Lagerung bei 4°C
LB-Broth-Medium, pH 7.3	1% Bacto-Trypton 1% NaCl 0.5% Bacto-Hefeextrakt gelöst in H ₂ O deion., autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N2, pH 6.3	100 mM Tris-HCl, pH 6.3 1.15 M KCl 15% Ethanol 0.15% (v/v) Triton X-100 gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N3, pH 6.3	100 mM Tris-HCl, pH 6.3 1.15 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
Puffer N5, pH 8.5	100 mM Tris-HCl 1 M KCl 15% Ethanol gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur

4. Materialien

Puffer S1, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Puffer S2	0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS gelöst in H ₂ O deion., Lagerung Raumtemperatur
Puffer S3, pH 5.1	2.8 M K-Acetat gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Tetracyclin	6.5 mg/ml gelöst in 1 ml H ₂ O deion., sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
TfBI (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>)	100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerol gelöst in H ₂ O deion., autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur
TfBII, (Transformationspuffer für <i>E. coli</i>) pH 7.0	75 mM CaCl ₂ 10 mM Na-MOPS 10 mM KCl 15 % Glycerol gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
TYM-Medium, pH 7.3	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl 2 g MgSO ₄ gelöst in H ₂ O deion., autoklaviert, Lagerung bei Raumtemperatur

4. Materialien

Tabelle 9: Puffer für mRNA-Isolation

Elutionspuffer, pH 7.5	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
Hochsalzpuffer, pH 7.5	10 mM Tris-HCl 0.5 M NaCl 1 mM EDTA gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
Niedrigsalzpuffer, pH 7.5	10 mM Tris-HCl 0.1 M NaCl 1 mM EDTA gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 10: Puffer für Phenol/Chloroform Extraktion

Protein-Extraktionspuffer I, pH 7.5	0.3 M Guanidiumhydrochlorid gelöst in 95% Ethanol, Lagerung bei Raumtemperatur
Protein-Extraktionspuffer II, pH 8	8 M Harnstoff 200 mM NaCl 47.4 mM Na ₂ HPO ₄ 2.6 mM NaH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur

4. Materialien

Tabelle 11: Medium für Zellkultur

Glucose Stocklösung	2 M D-(+)-Glucose gelöst in H ₂ O deion., sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Trypsin/EDTA Lösung, pH 7.5	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA gelöst in PBS, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

Tabelle 12: Puffer für zelluläre Proteinextraktion

Ripa-Puffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.5% Natriumdesoxycholat 1% (v/v) Triton X-100 0.1% SDS gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
PBS, pH 7.4	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 13: Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

APS	10% Ammoniumpersulfat gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Coomassie-Blau-Färbelösung	0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 50% Methanol 10% Essigsäure 39.79% H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur

4. Materialien

Elektrophoresepuffer (10 x), pH 8.8	250 mM Tris-HCl 1.92 M Glycin 35 mM SDS gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Entfärbe-Lösung	10% Eisessig 20% Methanol 70% H ₂ O deion., Lagerung bei Raumtemperatur
Gellösung A, Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid Lagerung bei 4°C
Gellösung B, Trenngel, pH 8.8	1.5 M Tris-HCl 14 mM SDS gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Gellösung C, Sammelgel, pH 6.8	495 mM Tris-HCl 14 mM SDS gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
SDS-Probenpuffer (3 x), pH 6.8	195 mM Tris-HCl 30% Glycerol 15% β-Mercaptoethanol 6% SDS 0.03% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 14: Puffer für Western Blot

Blockpuffer, pH 7.4	5% (w/v) Trockenmilchpulver 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
H ₂ O ₂ -Lösung, pH 8.5	1 M Tris-HCl 0.2% H ₂ O ₂ , Lagerung bei 4°C

4. Materialien

Inkubationspuffer/Waschpuffer I, pH 7.4	1% (w/v) Trockenmilchpulver 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
Luminol-Lösung, pH 8.5	1 M Tris-HCl 250 mM Luminol, gelöst in DMSO 90 mM PCA, gelöst in DMSO, autoklaviert, Lagerung bei 4°C
TBS, pH 7.4	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Transferpuffer (10 x), pH 8.3	200 mM Tris-HCl 1.5 M Glycin gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
Waschpuffer II, pH 7.4	0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C

Tabelle 15: Puffer für Coimmunpräzipitation

Blockierungslösung, pH 7.4	10% BSA gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C
----------------------------	---

Tabelle 16: Puffer für *in vitro*-CK2 Kinase-Assay

CK2 Kinasepuffer, pH 7.5	50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
--------------------------	--

4. Materialien

CK2 Reaktionsmix, pH 8.5	41.6 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 8.4 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 84 mM ATP 0.32 mM synthetisches Peptid für CK2 Sequenz: RRRDDDSDDD, wobei R für eine beliebige Aminosäure steht gelöst in H ₂ O deion., Lagerung bei 4°C
--------------------------	--

Tabelle 17: Puffer für Immunfluoreszenz

DAPI-Stammlösung, pH 7.4	5 µg/ml gelöst in 980 µl PBS oder Methanol, Lagerung bei -20°C
Fixierlösung, pH 7.4	3.7% Formaldehyd gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Mounting Medium, pH 7.4	10% Glycerol 5% Polyvinylalkohol 25/140 gelöst in PBS, autoklaviert, Lagerung bei -20°C
Permeabilisierungslösung, pH 7.4	2% BSA 0.2% (v/v) Triton X-100 gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Waschlösung, pH 7.4	1% BSA gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C

4. Materialien

Tabelle 18: Puffer für "Proximity Ligation Assay" (PLA)

Waschpuffer A, pH 7.4	0.01 M Tris-HCl 0.15 M NaCl 0.05% (v/v) Tween 20 gelöst in H ₂ O deion., sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Waschpuffer B, pH 7.5	0.2 M Tris-HCl 0.1 M NaCl gelöst in H ₂ O deion., sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

Tabelle 19: Puffer für Färbung von Gewebeschnitten

Blockierungslösung, pH 7.4	3% Kaninchen-Serum 1% (v/v) Triton X-100 gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Inkubationslösung, pH 7.4	1% Kaninchen-Serum 1% (v/v) Triton X-100 gelöst in PBS, die Lösung muss frisch angesetzt werden
Waschlösung, pH 7.4	1% (v/v) Triton X-100 gelöst in PBS, Lagerung bei 4°C

Tabelle 20: Stocklösungen für CK2 Inhibitoren

CX-4945 Stocklösung	10 mM CX-4945 gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
Quinalizarin Stocklösung	10 mM Quinalizarin gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C
TBB Stocklösung	10 mM TBB gelöst in DMSO, Lagerung bei -20°C

4.11 Computerprogramme

Tabelle 21: Verwendete Computerprogramme und Internet Websites

Typ	Name	Quelle
Detektionsprogramm für DNA und Proteine	BioRad Quantity One [®] 1-D Analysis Software 4.6.5	BioRad, München
DNA- und Protein-Informationen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ http://uniprot.org	National Center for Biotechnology Information Uniprot
Light Cycler [®] Analyseprogramm	Light Cycler [®] Software 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luciferase-Assay Analyseprogramm	Tecan i-control [™] 1.7	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Light Cycler [®] Analyseprogramm	Light Cycler [®] Software 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primerdesign	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ OligoAnalyzer	National Center for Biotechnology Information Integrated DNA Technologies
Reference Manager	Reference Manager 12	Adept Scientific

5. Methoden

5.1 DNA-Techniken

5.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte *in vitro*. Dabei wird die Eigenschaft der DNA-Polymerasen an ein freies 3'-Hydroxy-Ende eines kurzen DNA-Stückes, dem sogenannten Primer, weitere Basen anzuhängen, ausgenutzt. Die hohe Zahl der Amplifikate kommt dadurch zustande, dass in mehreren Zyklen, in denen abwechselnd die Polymerase aktiv ist, oder die DNA-Stränge aufgeschmolzen werden, ein einziger Ursprungsstrang exponentiell vermehrt werden kann. Als DNA-Polymerase braucht man jedoch wegen der hohen Temperaturen, die zum Aufschmelzen der DNA benötigt werden, eine thermostabile Polymerase. Die PCR wird im Thermomixer comfort durchgeführt.

Tabelle 22: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponenten	25 µl Reaktionsvolumen	Endkonzentration
Nuklease-freies Wasser	ad 25 µl	/
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2.5 µl	1 x
10 mM dNTPs	0.5 µl	200 µM
10 µM 3' Primer	0.5 µl	0.2 µM
10 µM 5' Primer	0.5 µl	0.2 µM
Template DNA	variabel	< 1 µg
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0.125 µl	1.25 Units

Ein Standardprotokoll für die PCR ist im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 23: Bedingungen der PCR

Reihenfolge	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung der DNA	95°C	1 Minute
2 Denaturierung der DNA	95°C	0.5 Minuten
3 Anlagerung der Primer	T _m Primer (°C)	0.75 Minuten
4 DNA-Synthese	72°C	2.5 Minuten
5 Vervollständigung der Synthese	72°C	10 Minuten

} 35 Zyklen

5.1.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet man die Agarosegelelektrophorese. Zur Herstellung der Gele wird eine entsprechende Menge an Agarose (die Konzentration der Agarose wird in % (w/v) angegeben) mit TAE-Puffer (400 mM Tris-Acetat, 200 mM Na-Acetat, 10 mM Na₃-EDTA, pH 7.2) versetzt und aufgekocht. Standardmäßig finden 1%-Agarosegele Verwendung. Die Agaroselösung wird im Wasserbad auf circa 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (Verdünnung 1:10.000 aus einer Stammlösung mit c = 10 mg/ml) und dann in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach der Polymerisation wird das Gel in eine Horizontal-Gel-Apparatur überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben werden mit DNA-Probenpuffer (80% 2 x TAE-Puffer, 20% Glycerol, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF) versetzt und auf der Kathodenseite aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Stromstärke von 100-200 Milliampère. Das erhaltene Bandenmuster wird auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wird der "GeneRuler™ DNA 1 kb Ladder" verwendet. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit dem Universal Hood II-System der Firma BioRad detektiert.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentrations-Messung erfolgt in einer UV-Quarzküvette mithilfe eines Spektrometers. Das Verhältnis OD_{260nm} zu OD_{280nm} zeigt die Proteinkontamination in der Lösung an. Die Konzentration der DNA errechnet sich aus der OD_{260nm}, dem Verdünnungs-

faktor und einem Multiplikationsfaktor, welcher spezifisch für DNA und RNA ist. Für DNA sollte der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} zwischen 1.8 und 2.0 liegen und für RNA sollte er größer als 1.9 sein.

5.1.4 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien wird nach dem Protokoll von Hanahan, 1983 [68] durchgeführt. Dazu werden 50 µl Bakterien in 20 ml TYM-Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, 2 g $MgSO_4$, pH 7.3) bei 37°C inkubiert bis eine optische Dichte $OD_{600nm} = 0.5$ erreicht ist. Man verdünnt die Bakterienkultur auf 100 ml mit TYM-Medium bis zum erneuten Erreichen der oben genannten OD, um die 100 ml Kultur abschließend auf 500 ml zu verdünnen. Beim Erreichen einer $OD_{600nm} = 0.6$ wird die Bakterienkultur durch Schütteln in einem NaCl-Eiswasserbad rasch abgekühlt und dann bei 4.000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Man resuspendiert das Bakterienpellet in 100 ml eiskaltem TfBI-Puffer (100 mM KCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM K-Acetat, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerol) und zentrifugiert erneut. Das Pellet wird in 20 ml kaltem TfBII-Puffer (75 mM $CaCl_2$, 10 mM Na-MOPS, 10 mM KCl, 15% Glycerol, pH 7.0) aufgenommen, in 200 µl Schritten in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgt bei -80°C.

5.1.5 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Vermehrung der gewünschten Plasmid-DNA muss diese durch eine Transformation in *E. coli* eingebracht werden. Hierzu werden 100 µl transformationskompetente *E. coli* (*XLI-BLUE*) Zellen mit 500 ng rekombinanter Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Inkubation werden die Ansätze für 50 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und sofort wieder bei 4°C abgekühlt. Den Zellen wird 800 µl LB-Broth-Medium (1% Bacto-Trypton, 1% NaCl, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, pH 7.3) zugegeben. Nach ein-stündiger Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler werden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen. Das Zellpellet wird im verbleibenden Restüberstand resuspendiert. Die Zellen werden auf LB-Broth-Agarplatten (2% Bacto-Agar, 1% Bacto-Trypton, 1% NaCl, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, pH 7.3) ausplattiert, welchen Antibiotika zur Selektion zugegeben wurde. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag können die gewachsenen Klone weiter verwendet werden oder die Platten für 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

5.1.6 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wird vor der Isolation in *E. coli* wie in 5.1.5 beschrieben vermehrt. Von jeder Selektionsplatte wird ein Klon in 100 ml LB-Broth-Medium (1% Bacto-Trypton, 1% NaCl, 0.5% Bacto-Hefeextrakt, pH 7.3) mit entsprechendem Selektionsantibiotikum überimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Bakterienkultur 15 Minuten bei 6.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird mithilfe des „Nucleobond® PC 100 Kit“ isoliert. Dazu wird das Pellet in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) + RNase A (100 µg/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) wird das Pellet 5-6 mal invertiert. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur (20-25°C) für 2-3 Minuten. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S3 (2.8 M K-Acetat, pH 5.1) wird die Lösung durch Invertieren vorsichtig gemischt und anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Filtrierung der Lösung werden DNA und Zelltrümmer abgetrennt. Das Filtrat wird auf eine Nucleobond®-Säule gegeben, welche zuvor mit 2 ml N2 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.3, 1.15 M KCl, 15% Ethanol, 0.15% (v/v) Triton X-100) äquilibriert wird. Anschließend wird die Säule mit 10 ml Puffer N3 (100 mM Tris-HCl, pH 6.3, 1.15 M KCl, 15% Ethanol) gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 5 ml N5 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 M KCl, 15% Ethanol) in ein silanisiertes Corex®-Röhrchen eluiert wird. Die Zugabe von 3.5 ml reinem Isopropanol führt zur DNA-Fällung. Nach anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 16.240 x g und 4°C wird die DNA mit Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl sterilem, destilliertem H₂O resuspendiert.

5.2 RNA-Techniken

5.2.1 mRNA-Isolation

Zur Isolation von mRNA werden verschiedene Kits angeboten, welche die Eigenschaft der mRNA über ihren Poly-A-Schwanz an Oligo-dT-Cellulose zu binden ausnützen. Für die mRNA-Isolation wird der „QuickPrep micro mRNA Purification Kit“ verwendet. Die Zellen werden durch einen Puffer mit hohem Gehalt an Guanidinium-Thiocyanat, als RNase-Inhibitor, lysiert und anschließend mit Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) dreifach verdünnt. Nach Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation wird das Lysat auf Oligo-dT-Cellulose (25 mg/ml) gegeben und gemischt, wobei die Bindung der mRNA über den Poly-A-Schwanz an die Oligo-dT-Cellulose stattfindet. Die Cellulose wird durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgen 5 Waschschrte mit einem Hochsalzpuffer bestehend aus 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl und 1 mM EDTA.

Nach weiteren 5 Waschschritten mit Nidrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA) wird schließlich die polyadenylierte mRNA mit 2 x 200 µl Elutionspuffer in ein RNase-freies Reaktionsgefäß eluiert (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Anschließend wird eine Bestimmung der mRNA-Konzentration durchgeführt. Falls die RNA nicht direkt weiterverwendet wird, kann sie aliquotiert bei -80°C gelagert werden.

5.2.2 Reverse Transkription

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben von mRNA in eine sogenannte cDNA. Die cDNA-Synthese erfolgt mithilfe der reversen Transkriptase „SuperScript™“. Zuerst werden in einem Gesamtansatz von 12 µl 1 µl Oligo-dT-Primer mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 - 500 ng der mRNA zusammengegeben, für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Nun werden pro Ansatz 4 µl 5 x Erst-Strang-Synthesepuffer 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl RNaseOUT™ als RNase-Inhibitor hinzugefügt und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert bevor 1 µl (200 Units) der reversen Transkriptase "SuperScript™" zugegeben werden. Die Reaktion findet für 50 Minuten bei 42°C statt bevor das Enzym für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert wird. Im Folgenden kann mit den erhaltenen Proben eine komparative PCR unter denselben Bedingungen wie in 5.1.1 beschrieben, durchgeführt werden.

5.2.3 Phenol/Chloroform Extraktion

Die Extaktion ist zur gleichzeitigen Isolation von RNA und Proteinen geeignet. Während der gesamten Extraktion werden Filterspitzen benutzt und unter dem Abzug gearbeitet, da alle Substanzen gesundheitsschädlich sind. Die Zellen werden abtrypsiniert und einmal mit PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen. Anschließend werden sie in 1 ml Trizol Reagent gut resuspendiert (1 ml pro 5-10 x 10⁶ Zellen; nie weniger als 500 µl). Zuerst wird die Lösung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und danach erfolgt eine Inkubation von 2-3 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Suspension bei 12.000 x g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Es bilden sich 3 Phasen: in der wässrigen Phase befindet sich die RNA (oben); in der Mitte ist die DNA und in der organischen Phase befinden sich die Proteine (unten). Die obere, wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen. Die wässrige Phase wird in ein neues autoklaviertes 1.7 ml Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen Phasen werden zur späteren Weiterbehandlung zur Seite gestellt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol zur wässrigen Phase wird die Suspension

gemischt und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4°C. Es entsteht ein sehr kleines weißes Pellet. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird 2 x mit je 1 ml 75% Ethanol gewaschen und zwischenzeitlich für 5 Minuten bei 7.500 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wird das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30-40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nach zehnminütigem Kochen bei 55°C kann die RNA bei -80°C aufbewahrt werden. Zur Isolation der Proteine werden 300 µl Ethanol zur organischen Phase gegeben, durch Invertieren gemischt und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird bei 2.000 x g und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf 2 frische 1.7 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt (ca. 400 µl pro Reaktionsgefäß). Anschließend werden 750 µl Isopropanol (1.5 ml Isopropanol pro ml Trizol) pro Reaktionsgefäß dazugegeben, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C. Der Überstand wird verworfen und die Pellets 3 x mit je 1 ml Protein-Extraktionspuffer I (0.3 M Guanidiumhydrochloridlösung in 95% Ethanol, pH 7.5) gewaschen (2 ml Guanidiumhydrochlorid pro ml Trizol), wobei die Proben zwischen den Waschschritten 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C und 7.500 x g 5 Minuten zentrifugiert werden. Anschließend werden die Pellets in 1 ml Ethanol (2 ml pro ml Trizol) gewaschen, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 7.500 x g, 4°C zentrifugiert. Die beiden Pellets in den 1.7 ml Reaktionsgefäßen werden vereint und getrocknet bis sie leicht transparent scheinen. Im Anschluss erfolgt die Resuspension in 50-100 µl Protein-Extraktionspuffer II (8 M Harnstoff, 200 mM NaCl, 47.4 mM Na₂HPO₄, 2.6 mM NaH₂PO₄, pH 8), eine zehnminütige Inkubation bei 50°C, sowie eine abschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 10.000 x g. Der Überstand wird in ein neues 1.7 ml Reaktionsgefäß überführt und kann bei -20°C aufbewahrt werden.

5.2.4 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT-*Real time*-PCR)

Die qRT-*Real time*-PCR ermöglicht es, die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen und die mRNA zu quantifizieren. Die Messung wird mit dem Quantitect[®] SYBR[®] Green RT-PCR-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Der qRT-*Real time*-PCR liegt das Prinzip der konventionellen PCR zu Grunde. Bei der qRT-*Real time* -PCR wird die zuvor hergestellte cDNA amplifiziert und jeweils nach der Elongationsphase eines PCR-Zyklus quantifiziert. Diese Quantifizierung erfolgt durch eine Messung der Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR[®] Green. Dieser lagert sich an die kleine Furche der dsDNA und bildet in gebundener Form einen fluoreszierenden Komplex, der blaues Licht bei $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ absorbiert und grünes

Licht bei $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ emittiert. Die Fluoreszenzintensität von SYBR[®] Green steigt mit jedem Zyklus, weil die Menge an dsDNA mit jedem PCR-Zyklus exponentiell zunimmt. Die Fluoreszenzintensität ist erst aussagekräftig, wenn eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenz detektierbar ist. Von diesem Zeitpunkt an wird die Zunahme der Fluoreszenz in einer exponentiellen Kurve dargestellt. Die relative mRNA-Menge der Probe wird durch die Anzahl der PCR-Zyklen bestimmt, die eine Probe benötigt, um einen individuell festgelegten Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen. Dieser ist für alle gleich. Der Schnittpunkt der exponentiell wachsenden Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert wird "Crossing Point" (CP) genannt. Die CP-Werte einer Probe sind umgekehrt proportional zur initialen Templatemenge. Die Messung erfolgt im LightCycler[®].

Tabelle 24: Ansatz für die qRT *Real time*-PCR je LightCycler[®] Kapillare (20 μl).

Komponenten	Endkonzentration/Volumen
Template mRNA	50 ng
Primermix (25 μM)	5 μM
A. dest. (RNase-frei)	8 μl
Mastermix	10 μl
Enzymmix	0.2 μl

Ein Standardprotokoll für die qRT *Real time*-PCR ist im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 25: Bedingungen der qRT *Real time*-PCR

Reihenfolge	Temperatur	Zeit	
1 Reverse Transkription	50°C	20 Minute	
2 PCR Initialisierung	95°C	15 Minuten	
3 Denaturierung	94°C	0.4 Minuten	} 35-55 Zyklen
4 Anlagerung der Primer	T _m Primer (°C)	0.5 Minuten	
5 DNA-Synthese	72°C	0.5 Minuten	
6 Vervollständigung der Synthese	72°C	10 Minuten	

5.3 Zellkulturtechniken

5.3.1 Kultivieren der Zellen

Die in der Arbeit verwendeten pankreatischen β -Zelllinien MIN6 und β -TC3 werden in DMEM (5.5 mM Glucose) mit 15% FCS, 1% Glutamin und 100 μ M β -Mercaptoethanol bei konstanten 37°C, sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% in 100-mm Kulturschalen kultiviert.

5.3.2 Passagieren der Zellen

Für das Passagieren der Zellen wird das Medium der Zellen zunächst abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.1% (w/v) EDTA, pH 7.4) und Inkubation für 2 Minuten bei 37°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂, werden die Zellen abgelöst. Durch das EDTA (Chelatbildner) werden die für die Zell-Zell-Bindung wichtigen Ca²⁺-Ionen chelatiert. Die Protease Trypsin (0.1%) löst die Zellen aus ihrem Verband, indem sie die Proteinbrücken zwischen den Zellen und zum Gefäßboden spaltet. Nach Absaugen der Trypsin/EDTA-Lösung wird der Zellsuspension frisches Kulturmedium zugegeben und die abgelösten Zellen können in ein neues Kulturgefäß ausgesät werden. Um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern werden alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.3.3 Tauen von Zellen

Die Zellen werden in einem 37°C warmen Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und anschließend in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Durch langsame tropfenweise Zugabe des 10-fachen Volumens an Zellkulturmedium ohne FCS wird die Zellsuspension verdünnt. Die Zellen werden 7 Minuten bei 253 x g und 4°C abzentrifugiert, das Sediment in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

5.3.4 Einfrieren von Zellen

Zur Aufbewahrung von Säugerzellen über einen längeren Zeitraum können diese in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu werden die Zellen von der Kulturschale abtrypsiniert, in DMEM resuspendiert und bei 253 x g 7 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wird in eiskaltem DMEM mit 40% FCS resuspendiert. Unter ständigem Schütteln auf Eis wird DMEM mit 20% DMSO tropfenweise hinzugefügt. Die Zellen werden in gekühlte Kryoröhrchen überführt und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff inkubiert. Nach 2 Stunden können die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt und über Monate gelagert werden.

5.3.5 Ernten von Zellen

Die Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen bevor sie mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst werden. Nun werden die Zellen in ein Röhrchen überführt und 7 Minuten bei 4°C und 253 x g abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS wird das erhaltene Zellpellet direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und kurzzeitig bei -20°C aufbewahrt werden.

5.3.6 Beseitigung von Kontaminationen

Bakterielle Kontaminationen werden, nach vorangegangenem mehrmaligen Waschen mit Medium, durch die Zugabe von 10 µl Penicillin/Streptomycin (10.000 U Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) pro ml Zellkulturmedium beseitigt. Bei schweren Kontaminationen durch Bakterien werden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert, in 5 ml serumfreiem Medium in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 7 Minuten bei 4°C und 250 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen auf eine neue Schale, unter Antibiotikazugabe, ausgesät. Hefe-

und Pilzkontaminationen werden mit 10 µl Amphotericin B (250 µg/ml) pro ml Zellkulturmedium behandelt.

5.3.7 Bestimmung der Lebendzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl wird mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor = 104) bestimmt. Frisch trypsinierte Zellen werden in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen und 20 µl der Suspension wird mit gleicher Menge an Trypanblau gemischt um tote Zellen anzufärben. Die Suspension wird zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Ausgezählt werden jeweils die äußeren 4 Quadrate. Nach Berechnung des Mittelwerts für ein Quadrat erhält man durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

5.3.8 Transiente Transfektion von Zellen mit Turbofect®

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Hierfür werden meist spezielle Expressionsvektoren verwendet. Die DNA gelangt in die Zelle, indem sie die Zellmembran passiert. Im Zellkern wird die Information der DNA in mRNA transkribiert und es kommt zur Expression der im Vektor codierten Gene. In den Experimenten wird die Transfektion mit dem Turbofect® Transfektionsreagenz durchgeführt. Für eine effiziente Transfektion werden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz zwischen 70% und 90% aufweisen. Zur Transfektion wird die entsprechende Menge DNA und Turbofect® Transfektionsreagenz in Serum-freiem Medium gemischt. Der Ansatz wird 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz ins Zellmedium gegeben und die Zellen je nach Versuch inkubiert. In Tabelle 26 sind die Mengenverhältnisse der Transfektion für eine 24-Lochplatte, eine 6-Lochplatte, eine 60-mm Schale und eine 100-mm Schale angegeben.

Tabelle 26: Transfektionsansätze

Kulturformat	Turbofect® Reagenz (µl)	DNA (µg)	Kultivierungsmedium (ml)	Serum-freies Medium (ml)
24-Lochplatte	2	1	1	0.1
6-Lochplatte	6	4	4	0.4
60-mm Schale	12	6	6	0.6
100-mm Schale	15	10	10	1

5.4 Proteinchemische und immunologische Arbeitsmethoden

5.4.1 Herstellung von Zellextrakten zur Proteinanalyse

Die Zellen werden ausgesät und bei einer Konfluenz von circa 80% mit PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) geerntet und abzentrifugiert (250 x g, 7 Minuten, 4°C). Das Pellet wird in doppeltem Volumen Ripa-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS) aufgenommen und mit Complete™ (Proteaseinhibitor Cocktail, 1:25) 20 Minuten auf Eis inkubiert und zwischenzeitlich geschüttelt. Danach wird die Suspension 3 x 30 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um die Zellen aufzuschließen. Im Anschluss werden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung kann der Zellextrakt kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C aufbewahrt werden.

5.4.2 Herstellung von Zellextrakten aus Gewebestücken

Zur Herstellung von Zellextrakten aus primärem Gewebe wird das Gewebestück in flüssigem Stickstoff bis zur Pulverform gemörsert. Anschließend wird das entstandene Pulver zügig in Ripa-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS) mit zugesetztem Proteaseinhibitor (Complete™ 1:25) aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, wobei das Volumen an Puffer etwa dem doppelten Volumen des Gewebeteilchens entspricht. Nach einstündiger rollender Inkubation des gelösten Gewebematerials bei 4°C gefolgt von einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 16.000 x g und 4°C kann der erhaltene Überstand für eine Proteinbestimmung eingesetzt werden.

5.4.3 Proteinquantifikation nach Bradford

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts einer Proteinlösung erfolgt meist mithilfe von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen und kann mit einem Photometer gemessen werden. Bei dieser Methode nutzt man die Farbreaktion, die dadurch entsteht, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 im sauren Milieu mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert. Das Absorptionsmaximum des

Farbstoffes wird in Anwesenheit von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm verschoben und kann photometrisch vermessen werden.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt mithilfe des BioRad Protein Reagenzes. Dazu wird je 1 µl Zellextrakt mit 800 µl H₂O deion. und 200 µl BioRad Protein Reagenz gemischt. Nach 5 Minuten kann die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen werden. Der Proteingehalt ergibt sich mithilfe einer BSA-Eichkurve in µg/µl.

5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese beruht auf der Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe in einer Polyacrylamid-Gelmatrix. Kleine Proteine wandern im elektrischen Feld schneller durch die Poren der Matrix als große Proteine. Zusätzlich werden die Proteine mit Probenpuffer versetzt, der SDS (195 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 6% SDS, 0.03% (w/v) Bromphenolblau,) enthält, welches als anionisches Detergenz Mizellen um die Proteine bildet und ihnen eine negative Ladung verleiht. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld je nach Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Durch Erhitzen der Proteinprobe auf 95°C werden zudem Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zerstört. Zur Aufspaltung von Disulfidbrücken wird dem Probenpuffer β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zugegeben. Dies ermöglicht eine optimale Auftrennung der Proteine. Die einzelnen Bestandteile der Gelkammer werden vor dem Zusammenbau gründlich mit Ethanol gereinigt. Anschließend wird die Kammer zu 75% mit Trenngel gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Zur gleichmäßigen Verteilung des Trenngels werden die Kämme in die Gelkammern gesteckt. Sobald das Trenngel ausgehärtet ist, werden die Kämme entfernt und das Isopropanol abgegossen. Das Sammelgel wird in die Kammer gefüllt und die Kämme werden ganz in die Gelkammern gesteckt. Ist auch das Sammelgel auspolymerisiert, können die Gele verwendet oder feucht und kühl bei 4°C gelagert werden. Zur Herstellung beider Gele wird eine Acrylamid-Stammlösung (Lösung A: 30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid) verwendet. Für das Trenngel wird die Pufferlösung B (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 14 mM SDS), für das Sammelgel die Pufferlösung C (495 mM Tris-HCl, pH 6.8, 14 mM SDS) zugegeben. Das Pipettierschema für die Herstellung verschieden prozentiger SDS-Polyacrylamidgele ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Zusammensetzung der verschiedenen SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel (%)	7.5	10	12.5	15	20	Sammelgel (%)	4.3
Lösung A (ml)	9	12	15	18	24	Lösung A (ml)	2.2
Lösung B (ml)	9	9	9	9	9	Lösung C (ml)	3.8
Wasser (ml)	18	15	12	9	3	Wasser (ml)	9
APS (µl)	200	200	200	200	200	APS (µl)	100
TEMED (µl)	20	20	20	20	20	TEMED (µl)	40

Nachdem das SDS-Polyacrylamidgel fertig gegossen ist, kann es in die Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small eingespannt und mit Elektrophoresepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.92 M Glycin, 35 mM SDS) befüllt werden. Die Proteinproben, sowie ein Proteingrößenstandard werden in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert, sodass die elektrophoretische Trennung der Proteine bei 25 Milliampère pro Gel für circa 1.5 Stunden erfolgen kann.

5.4.5 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Die über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine können durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Dazu wird das Gel für 20 Minuten in der Coomassie-Blau-Färbelösung (0.2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R250, 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250, 50% Methanol, 10% Eisessig, 39.79% H₂O deion.) fixiert und gefärbt, anschließend in einem Gemisch aus 10% Eisessig, 20% Methanol und 70% H₂O deion. entfärbt, sodass die Proteinbanden deutlich sichtbar werden.

5.4.6 Western Blot Analyse

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die aufgetrennten Proben im Tank-Blot-System auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die Apparatur für den Proteintransfer wird nach folgendem Schema zusammengebaut:

Schwamm	Whatman-Papier (3 x)	SDS-Polyacrylamidgel	PVDF-Membran	Whatman-Papier (3 x)	Schwamm
---------	----------------------	----------------------	--------------	----------------------	---------

Die Schwämme und Whatman-Papiere werden in Transferpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 M Glycin) und die PVDF-Membran zur Aktivierung in Methanol getränkt. Der Transfer auf die PVDF-Membran wird über Nacht bei 120 Milliampère vorgenommen.

5.4.7 Immunologischer Proteinnachweis

Nachdem die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet wurden, können sie mithilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Hierfür werden unspezifische Bindestellen zunächst durch Inkubation der Membran in Blockpuffer (PBS: 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄; 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4 mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver und 0.1% (v/v) Tween 20) für 1 Stunde abgedeckt. Anschließend wird der Primärantikörper in Inkubationspuffer (PBS, 1% (w/v) Trockenmilchpulver, 0.1% (v/v) Tween 20) auf die Membran gegeben. Verdünnung, Inkubationszeit sowie spezifische Puffersysteme können dem entsprechenden Datenblatt des Primärantikörpers entnommen werden. Nach der Inkubation wird die Membran zweimal für je 10 Minuten mit Waschpuffer I (PBS, 1% (w/v) Trockenmilchpulver, 0.1% (v/v) Tween 20) gewaschen um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wird der Sekundärantikörper in Inkubationspuffer für eine Stunde auf die Membran gegeben. Dieser ist je nach Primärantikörper gegen Ziege, Maus oder Kaninchen gerichtet, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und bindet an die Fc-Domäne des Primärantikörpers. Nach zweifachem Waschen in Waschpuffer II (PBS, 0.1% (v/v) Tween 20) für je 10 Minuten kann der Blot entwickelt werden. Die Proteine werden mit dem „Lumi-Light“ Reagenz detektiert. Die Membran kann nach der Detektion nach kurzer Inkubation in Methanol getrocknet und bei 4°C aufbewahrt werden. Eine Quantifizierung der Blots ist mit der Software Quantity One[®] 1-D 4.6.5 möglich.

5.4.8 Coimmunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung eines bestimmten Antigens aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung. Ermöglicht wird dies durch die reversible Bindung der Fc-Domäne des Antikörpers an Protein-A-Sepharose. Unter physiologischen Pufferbedingungen ist es auch möglich, an das präzipitierte Protein weitere gebundene Proteine zu präzipitieren (Coimmunpräzipitation). Im Präzipitat bestimmt man dann die Antigene über ihr Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel. Die Inkubationsschritte der Immunpräzipitation werden bei 4°C durchgeführt und alle Lösungen und Puffer müssen ebenfalls auf 4°C vorgekühlt sein. Die entsprechenden Zellen werden geerntet und in Ripa-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS) und Complete[™] (1:25) aufgenommen, 20 Minuten auf Eis bei gelegentlichem vortexen inkubiert und im Anschluss 30 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen. Pro Präzipitation werden 30-60 µl 50%-Sepharosegemisch aus Protein-A-Sepharose und CL-4B-Sepharose (Verhältnis 1:3) einge-

setzt. Die Sepharose CL-4B dient lediglich der Volumenvergrößerung. Nachdem die Sepharose 2 x mit PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen und zur Verringerung der unspezifischen Bindungen insgesamt 1 Stunde mit PBS + 10% BSA vorgeblockt wurde, wird diese in 4 gleichen Teilen in Eppendorfgläser aufgeteilt (1. Vorpräzipitat, 2. Vorpräzipitat, Immunpräzipitat, Sepharosekontrolle). Die entsprechende Menge des Zellextrakts wird nun zu der Sepharose des 1. Vorpräzipitats gegeben, das Reaktionsgefäß mit der Sepharose für das 2. Vorpräzipitat wird weiterhin mit PBS und 10% BSA inkubiert, die für die Immunpräzipitation vorgesehene Sepharose wird mit PBS + 10% BSA, sowie dem jeweiligen zu präzipitierenden Antikörper versehen (10 µl monoklonaler Antikörper bzw. 30 µl gereinigtes Kaninchen-Serum). Alle Ansätze werden 1 Stunde unter Rollen bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wird das 2. Vorpräzipitat zweimal mit PBS gewaschen, bevor der nach Zentrifugation des 1. Vorpräzipitats erhaltene Überstand auf die 2. Vorpräzipitat-Sepharose übertragen wird. Die Sepharose für das 2. Vorpräzipitat und das Immunpräzipitat werden erneut 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wird die Immunpräzipitat-Sepharose, zum Entfernen von nicht gebundenem Antikörper, zweimal mit PBS gewaschen, bevor der nach Zentrifugation des 2. Vorpräzipitats erhaltene Überstand auf das Immunpräzipitat übertragen wird. Die Inkubation mit der Antikörper gebundenen Sepharose erfolgt für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend werden alle Proben 4 x mit PBS gewaschen, mit 30 µl 3 x SDS-Probenpuffer (195 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 6% SDS, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau) versehen, gekocht und mit den Kontrollproben wie Zellextrakt, Überstand, Immunpräzipitat, Antikörperkontrolle und Sepharosekontrolle auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung werden die Proteinproben auf eine PDVF-Membran geblottet. Copräzipitierte Proteine können mit einem spezifischen Antikörper auf der PVDF-Membran nachgewiesen werden.

5.4.9 *In vitro*-CK2 Kinase-Assay

Die enzymatische Aktivität der Proteinkinase CK2 wird über den Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat (³²PO₄³⁻) in ein synthetisches Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD gemessen, dessen Serin durch CK2 phosphoryliert werden kann [124]. Die Menge des eingebauten Phosphats wird über die Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Nachdem die Zellen geerntet, in Ripa-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Natriumdesoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS) aufgeschlossen und der Proteingehalt bestimmt wurde, werden 30 µg Protein in 20 µl CK2 Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl,

pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, gelöst in H₂O deion.) aufgenommen. Es werden 30 µl CK2 Mix (10 µCi/500 µl [³²P]-γ-ATP; CK2 Reaktionsmix: (25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µM ATP, 0.19 mM (Endkonzentrationen) synthetisches Peptid für CK2) hinzupipetiert. Die Lösung wird 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis gelagert. Vierzig µl der Probe wird auf Whatman P81 Ionenaustausch-Filterpapier übertragen, welches das Peptidsubstrat bindet. Das Whatman Papier wird 3 x für je 5 Minuten mit 85 mM Phosphorsäure gewaschen. Es folgt ein fünfminütiger Waschschrift mit Ethanol (technisch). Durch die Waschschriffe wird nicht in das Peptid eingebautes Phosphat entfernt. Das Filterpapier wird getrocknet (gegebenenfalls unter Rotlicht) und anschließend in ein Szintillationsröhrchen überführt. Mithilfe der Čerenkov-Strahlung kann im Szintillationszähler die Aktivität der Probe gemessen werden. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Kontrollen werden eine Negativ-Kontrolle (20 µl CK2 Kinasepuffer mit 2 µl Ripa-Puffer) und eine Positiv-Kontrolle (18 µl CK2 Kinasepuffer mit 2 µl CK2-Holoenzym) mitgeführt.

5.4.10 *In vitro*-Phosphorylierung von gereinigten, rekombinanten Proteinen

In vitro-Phosphorylierungen werden zellfrei mittels gereinigter rekombinanter CK2 untersucht. Dazu wird das entsprechende rekombinante Protein mit CK2α oder dem CK2-Holoenzym und CK2 Kinasepuffer auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und gemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µCi [³²P]-γ-ATP gestartet. Der Ansatz wird nun über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Probenpuffer gestoppt und nachfolgend bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Proteine werden nachfolgend in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Coomassie-Blau gefärbt, entfärbt, getrocknet und autoradiographisch analysiert.

5.4.11 Autoradiographie

Radioaktiv-markierte Proteine werden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wird anschließend für circa 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Nachfolgend können die radioaktiv markierten Proteine mittels Röntgenfilm oder mithilfe von PhosphorImaging-Platten autoradiographisch detektiert und quantifiziert werden (mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zimmermann in Homburg).

5.4.12 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Für Immunfluoreszenzstudien werden die Zellen auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 50-70% kultiviert. Für die Antikörperfärbung werden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen aus den Kulturschalen entnommen, 5 x kurz in PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen und 15 Minuten in PBS + 3.7% Formaldehyd fixiert. Danach werden die Zellen 3 x 10 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen auf den Deckgläschen durch Inkubation in PBS + 2% BSA und 0.2% (v/v) Triton X-100 5 Minuten auf Eis permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen 3 x 10 Minuten in PBS + 1% BSA gewaschen, bevor die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS + 1% BSA für eine halbe Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C erfolgt. Für die Zellen, die der Kontrolle des sekundären Antikörpers dienen, erfolgt eine Inkubation in PBS + 1% BSA. Im Anschluss erfolgt ein erneuter Waschschrift in PBS (3 x 10 Minuten). Nach Zugabe des sekundären Fluorophor-konjugierten Antikörpers für eine halbe Stunde bei 37°C in PBS + 1% BSA in einer feuchten, dunklen Kammer werden die Zellen unter denselben Bedingungen wie zuvor gewaschen. Zudem wird eine Kernfärbung mit DAPI (5 µg/ml DAPI-Stammlösung in 980 µl PBS, pH 7.4) für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Waschen in PBS (3 x 5 Minuten) werden die Zellen einmal kurz in H₂O deion. gespült, bevor sie in einem Tropfen Mounting Medium (10% Glycerol, 5% Polyvinylalkohol 25/140, pH 7.4) aufgenommen und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden.

5.4.13 "Proximity Ligation Assay" (PLA)

Der "Proximity Ligation Assay" ist eine Methode zur Untersuchung der Lokalisierung sowie direkten Protein-Protein Interaktion in einer einzelnen Zelle. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass 2 primäre Antikörper unterschiedlicher Spezies zunächst ihr Target-Protein in der Zelle einzeln erkennen. Erkannt werden diese primären Antikörper von Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern, auch PLA Proben genannt, jeder mit einem kurzen Oligonukleotid gekoppelt, komplementär zu der zweiten verwendeten PLA Probe (PLA Probe MINUS und PLA Probe PLUS). Befinden sich die PLA Proben in räumlicher Nähe zueinander, kommt es zur Interaktion und Verbindung der beiden Oligonukleotide durch enzymatische Ligation. Durch Zugabe einer Amplifikationslösung, welche zusätzlich Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide enthält, entsteht durch „rolling circle amplification“ eine fluoreszierende Verbindung beider Proteine, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie als roter Spot sichtbar gemacht werden kann.

5. Methoden

Zur Durchführung des PLA wachsen die Zellen in 60 mm-Kulturschalen auf Deckgläschen bis die Kultur zu etwa 80% konfluent ist. Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen 5 x kurz in PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gespült bevor sie 3 x 10 Minuten ebenfalls in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen werden. Anschließend erfolgt die Fixierung in PBS + 3.7% Formalin bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Die Fixierungslösung sollte unmittelbar vor der Verwendung hergestellt werden. Es schließen sich 3 Waschschrte in PBS an. Die Permeabilisierung der Zellen wird mit PBS + 2% BSA + 0.2% (v/v) Triton X-100 für 5 Minuten auf Eis vorgenommen. Es folgen 3 Waschschrte für je 10 Minuten in PBS + 1% BSA zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Es schließt sich die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer an. Die Inkubation mit dem Antikörper gelöst in PBS + 1% BSA erfolgt für 30 Minuten bei 37°C. Eine Probe wird als Negativkontrolle statt des Primärantikörpers mit PBS + 1% BSA behandelt. Danach werden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Es schließt sich die Inkubation mit den PLA Proben als „Sekundärantikörper“ an. Dazu werden die beiden Spezies-spezifischen PLA Proben 1:5 in PBS mit BSA (1%) verdünnt und vor dem Gebrauch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit den PLA Proben erfolgen 2 Waschschrte in Waschpuffer A (0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) für je 5 Minuten. Für den anschließenden Ligationsschritt wird zunächst der Ligasestock 1:5 in H₂O deion. verdünnt und unmittelbar vor Gebrauch mit der Ligase (1:40) versehen. Die Inkubation der Zellen mit der Ligaselösung erfolgt für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. In der Zwischenzeit wird die Amplifikationslösung durch Verdünnen des Stocks 1:5 in H₂O deion. hergestellt. Auch hier ist darauf zu achten, dass die Polymerase (1:80) erst unmittelbar vor Gebrauch zu der Lösung pipettiert wird. Nach 2 x zweiminütigem Waschen der Zellen in Waschpuffer A kann die Inkubation mit der Amplifikationslösung in einer feuchten Kammer bei 37°C für 100 Minuten erfolgen. Die Inkubation muss im Dunkeln erfolgen, um ein zu starkes Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Im Anschluss werden die Zellen 2 x 10 Minuten in Waschpuffer B (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl), sowie nachfolgend 1 Minute in 0.01 x Waschpuffer B gewaschen. Nach dem Trocknen der Zellen auf den Deckgläschen erfolgt das Eindecken in Mounting Medium mit DAPI. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten erfolgt die Analyse der Präparate mittels Mikroskopie. Um die Präparate auch noch nach einigen Tagen betrachten zu können, werden sie mit farblosem Nagellack abgeschlossen und im Dunkeln bei -20°C aufbewahrt .

Der PLA eignet sich ebenfalls zur Färbung von Gewebeschnitten. Dazu müssen diese zunächst in 4% Formaldehyd in H₂O deion. für 5 Minuten fixiert und anschließend angetrocknet werden. Nach Eingrenzung des Schnittes mit dem Wachsstift Dako „Magic Pen“ werden diese kurz in H₂O deion. sowie anschließend in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 gespült. Nach Blockieren der unspezifischer Bindungen in 3% Kaninchen-Serum in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 werden die Schnitte 5 Minuten in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Alle folgenden Schritte des PLA werden analog zu den fixierten Zellen durchgeführt.

5.4.14 Lagerung von Gewebeschnitten

Werden frische Gewebeschnitte nicht direkt gefärbt sondern zunächst gelagert ist eine Fixierung der Schnitte in Aceton für 10 Minuten notwendig. Anschließend werden die Schnitte getrocknet und können bei -20°C für eine kürzere Aufbewahrung und bei -80°C für längerfristige Aufbewahrung eingelagert werden. Zur Färbung werden die Schnitte aufgetaut und angetrocknet. Eine erneute Fixierung ist nicht notwendig. Die Färbung erfolgt analog zu der von frischen Schnitten.

5.4.15 Färbung von Gewebeschnitten

Zur Färbung von primären Gewebeschnitten müssen sie zunächst in 4% Formaldehyd in H₂O deion. für 5 Minuten fixiert und anschließend angetrocknet werden. Mit dem Wachsstift Dako „Magic Pen“ kann nun ein Kreis um den Gewebeschnitt gezogen werden, was eine optimale Bedeckung des Gewebeschnitts mit den Färbelösungen gewährleistet. Danach werden die Schnitte kurz in H₂O deion. sowie anschließend in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen werden die Schnitte in 3% Kaninchen-Serum in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer geblockt. Nach einem Waschschrift von 5 Minuten in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 kann die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper in 1% Kaninchen-Serum in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer erfolgen. Im Anschluss werden die Schnitte zweimal je 10 Minuten in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 gewaschen bevor sie mit einem entsprechenden sekundären Antikörper in 1% Kaninchen-Serum in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer versehen werden. Nach einem erneuten Waschschrift von zweimal 10 Minuten in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 erfolgt bei Bedarf die Kernfärbung mit DAPI (5 µg/ml DAPI-Stammlösung, in 980 µl PBS, pH 7.4) für

15 Minuten bei 37°C. Nach einem abschließenden Waschschrift von zweimal 5 Minuten in PBS + 1% (v/v) Triton X-100 werden die Schnitte getrocknet und für die Mikroskopie in Mounting Medium (10% Glycerol, 5% Polyvinylalkohol 25/140, pH 7.4) eingedeckt.

5.4.16 Luciferase-Assay

Reporter gene werden in der Biologie zur Analyse der Genexpression eingesetzt und geben so zum Beispiel Aufschluss über die Aktivität des Promotors der zu untersuchenden Gene. Der Luciferase-Assay ist eine Methode, die im Vergleich zu herkömmlichen Methoden sowohl in ihrer Empfindlichkeit als auch in der Einfachheit verbessert ist. Da es sich bei Luciferase um ein monomeres Protein handelt, das keinerlei posttranslationale Prozessierung zur enzymatischen Aktivität benötigt, kann es sofort nach der Translation als Reporter fungieren. Beim Luciferase-Assay wird Lumineszenz durch eine ATP-abhängige Oxidation von Luciferin erzeugt. Der durch die Strukturänderung des Luciferins emittierte Lichtimpuls wird mithilfe eines Photodetektors aufgefangen. Gewöhnlich ist der Lichtimpuls klein und muss mit einem empfindlichen elektronischen Apparat wie einem Luminometer detektiert werden. Die Lichtintensität ist ein Maß der Enzymaktivität der Luciferase und ist deshalb abhängig von der Temperatur. Das Temperaturoptimum für die Luciferase liegt bei Raumtemperatur (20-25°C). Die Durchführung des Luciferase-Assay erfolgt mit dem Luciferase-Assay-System. Dazu werden Zellen in den Vertiefungen einer 24-Loch Platte ausgesät, mit dem Reporter, sowie der zu transfizierenden DNA bzw. dem CK2-Inhibitor versehen und für einen entsprechenden Zeitraum kultiviert. Danach wird das Medium der Zellen abgesaugt und pro Ansatz 100 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Die Platte wird im Anschluss 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, bevor die einzelnen Reaktionsansätze in 1.7 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 16.000 x g 1 Minute zentrifugiert werden. Vom Überstand wird eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgt anschließend in einem Microplate Luminometer. Hierzu werden 50 µl des Luciferase-Reagenzes pro Kavität einer weißen 96-Loch-Platte vorgelegt. Zu diesem Reagenz werden 20 µl der Extrakte gegeben und vermessen. In der nachfolgenden Reaktion setzt die durch das Reporter gen konstrukt exprimierte Firefly Luciferase das Substrat Luciferin in Oxyluciferin um. Hierbei wird ATP und O₂ zu AMP + PP_i und CO₂ umgesetzt. Gleichzeitig kommt es zu einer Lichtemission bei 560 nm, welche im Infinite M200 Pro TECAN Reader messbar ist. Die gemessene Lichtemission korreliert hierbei mit der vorhandenen Menge an Luciferase. Je Ansatz wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die relativen Luciferase-Messeinheiten der eingesetzten Zellextrakte werden im Anschluss auf gleiche Proteinmengen bezogen.

5.4.17 "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

Die Detektion des Insulingehaltes im Medium von Zellen erfolgt mit dem Rat/Mouse Insulin ELISA-Kit. Zur Durchführung wird zunächst das Medium der entsprechend behandelten Zellen entnommen und 1:10 verdünnt. Neben den Mediumproben müssen zur Sicherstellung der Richtigkeit des Assays zusätzlich 2 Qualitätskontrollen (QC1 und QC2) sowie Insulinstandards von 0.2 ng/ml bis 10 ng/ml, welche im Kit enthalten sind, mitgeführt werden. Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platten mit Waschpuffer werden die Kavitäten, in welche die Mediumproben zur Insulinbestimmung kommen mit je 10 µl Assay- Puffer beladen, wohingegen diejenigen, welche für die QC1 und QC2, sowie die Insulinstandards vorgesehen sind, mit 10 µl Matrix-Lösung beschichtet werden. Im Anschluss werden die entsprechenden Kavitäten jeweils in Doppelbestimmung mit den Insulinstandards, den QC bzw. den Mediumproben versehen (jeweils 10 µl). Im Anschluss werden 80 µl Detektions-Antikörper zu allen Proben pipettiert und die Kavitäten mit einer Plastikfolie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler schüttelnd inkubiert. Danach werden die in den ELISA-Platten enthaltenen Lösungen entfernt und anschließend dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgt die Zugabe von 100 µl Enzymlösung zu allen Kavitäten, sowie eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt schüttelnd auf dem Mikrotiter-Platten-Schüttler. Nachfolgend werden die Lösungen erneut durch Invertieren abgeschüttet und es folgt die Zugabe von 100 µl Substratlösung zu jeder Probe, welche bis zur deutlichen Blaufärbung schüttelnd inkubiert werden. Tritt die Blaufärbung bei allen Kavitäten ein, wird die Absorption der einzelnen Kavitäten im Infinite M200 Pro TECAN Reader bei 370 nm gemessen. Befindet sich diese im Bereich von 1.2 bis 1.8, werden jeweils 100 µl Stop-Lösung zugegeben und bis zur Gelbfärbung geschüttelt. Anschließend muss die Absorption der Kavitäten bei 450 nm und 590 nm innerhalb 5 Minuten ermittelt werden. Nach Differenzbildung der Absorptions-Units kann der Insulingehalt der Proben im Vergleich zu den Insulinstandards in ng/ml ermittelt werden.

Zur Erstellung der Abschnitte „Materialien" und "Methoden“ wurde das Methodenbuch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes zu Hilfe genommen.

6. Ergebnisse

Das Protein "Pancreatic Duodenal Homeobox-1", kurz PDX-1, ist als wichtigster pankreatischer Transkriptionsfaktor an einer Vielzahl von Prozessen im Pankreas beteiligt [3,229]. Er wird bereits in den embryonalen endokrinen, exokrinen und ductalen Vorläuferzellen bei der Pankreasentwicklung exprimiert [3,229] und spielt im adulten Organ eine entscheidende Rolle im Rahmen des Funktionserhaltes pankreatischer β -Zellen [3]. Seine Aufgabe im adulten Organismus besteht in der Regulation der Transkription von Genen wie GLUT2, Glucokinase und Somatostatin, welche für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase in den Inselzellen verantwortlich sind [106,219,223]. Vor allem die Glucose-stimulierte Insulingentranskription wird von dem pankreatischen Transkriptionsfaktor gesteuert [159]. Als Transkriptionsfaktor wird die Aktivität von PDX-1 über Phosphorylierung durch eine Vielzahl von Proteinkinasen reguliert, darunter die Glycogensynthase 3 Kinase, die "DNA-dependent Protein Kinase" oder die Per-Arnt-Sim Kinase [6,11,22,102,114]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh wurde entdeckt, dass PDX-1 auch von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert wird [139]. Erste Untersuchungen über die Wechselwirkung der beiden Proteine [138-140] legen einen Grundstein für die folgende Dissertation, bei der das Augenmerk der Assoziation von PDX-1 und CK2 auf die physiologische Bedeutung innerhalb der pankreatischen Zelle bei Prozessen, welche im Rahmen der Glucose-stimulierten Insulinsekretion ablaufen, gelegt wird. Auf diese Weise sollen neue Einblicke in die Regulation der Insulinsekretion im Pankreas erhalten werden.

6.1 PDX-1 und CK2 in murinen Inseln

Zur Überprüfung der biologischen Bedeutung der Interaktion der Proteinkinase CK2 und des pankreatischen Transkriptionsfaktors PDX-1 wurden zunächst Analysen am primären Mausmodell in Langerhansinseln durchgeführt. Zu Beginn war es essentiell zu untersuchen, ob die Assoziation beider Proteine aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation bei der Regulation der Insulinsekretion überhaupt eine Rolle spielt. Dazu wurde in Immunfluoreszenz-Analysen von Kryoschnitten muriner Langerhansinseln eine Lokalisationsstudie von PDX-1 und CK2 mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Diese Färbung wurde verknüpft mit der Verwendung von Inselzell-Markern zur subzellulären Orientierung. Als Marker für die einzelnen Inselzell-Typen wurden Proteine verwendet, welche spezifisch nur von dem jeweiligen Inselzell-Typ exprimiert werden. Zur Identifizierung der pankreatischen β -Zellen wurde Insulin als Marker benutzt, zur Darstellung der α -Zellen Glucagon und die δ -Zellen des Pankreas wurden mit Somatostatin sichtbar

gemacht. In Abbildung 4 A-C sind murine Inseln dargestellt, welche in Kombination von einem Kaninchen-Antiserum oder einem polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper gegen PDX-1 mit den Inselzell-Markern Insulin (A), Somatostatin (B), Glucagon (C), sowie Bisbenzimid zur Darstellung der Zellkerne gefärbt wurden. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Cy3-, ein Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488-Antikörper sowie ein Ziege-anti-Meerschweinchen-Alexa-FluorTM488-Antikörper eingesetzt. Durch Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle kann PDX-1 in den Kernen der Zellen sichtbar gemacht werden, welche auch Insulin exprimieren, was durch eine Rosafärbung der betreffenden Zellen angezeigt wird (Abbildung 4 A). Zusätzlich ist auch in einigen Zellen, welche Somatostatin produzieren, eine Rosafärbung des Zellkerns deutlich zu erkennen (Abbildung 4 B), wohingegen in den Glucagon-positiven Zellen keine PDX-1-Signale zu sehen sind. (Abbildung 4 C). Dieses Ergebnis bestätigt, dass PDX-1 in murinen Inselzellen in den β - und δ -Zellen, jedoch nicht in den α -Zellen lokalisiert ist. Um neben der subzellulären Lokalisation von PDX-1 auch die von CK2 α als potentielltem PDX-1-Interaktionspartner zu analysieren, wurde die gleiche Färbung auch mit dem Kaninchen-Antiserum #26 oder dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α in Kombination mit den Inselzell-Markern durchgeführt (Abbildung 4 D-F). Bei genauer Betrachtung kann in den Insulin-positiven Zellen auch eine deutliche Rosafärbung des Zellkerns entdeckt werden, in den mit Somatostatin und Glucagon gefärbten Zellen ist es nicht eindeutig möglich, CK2 α -positive Signale zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass CK2 α vor allem in den pankreatischen β -Zellen überwiegend im Zellkern vorhanden zu sein scheint.

6. Ergebnisse

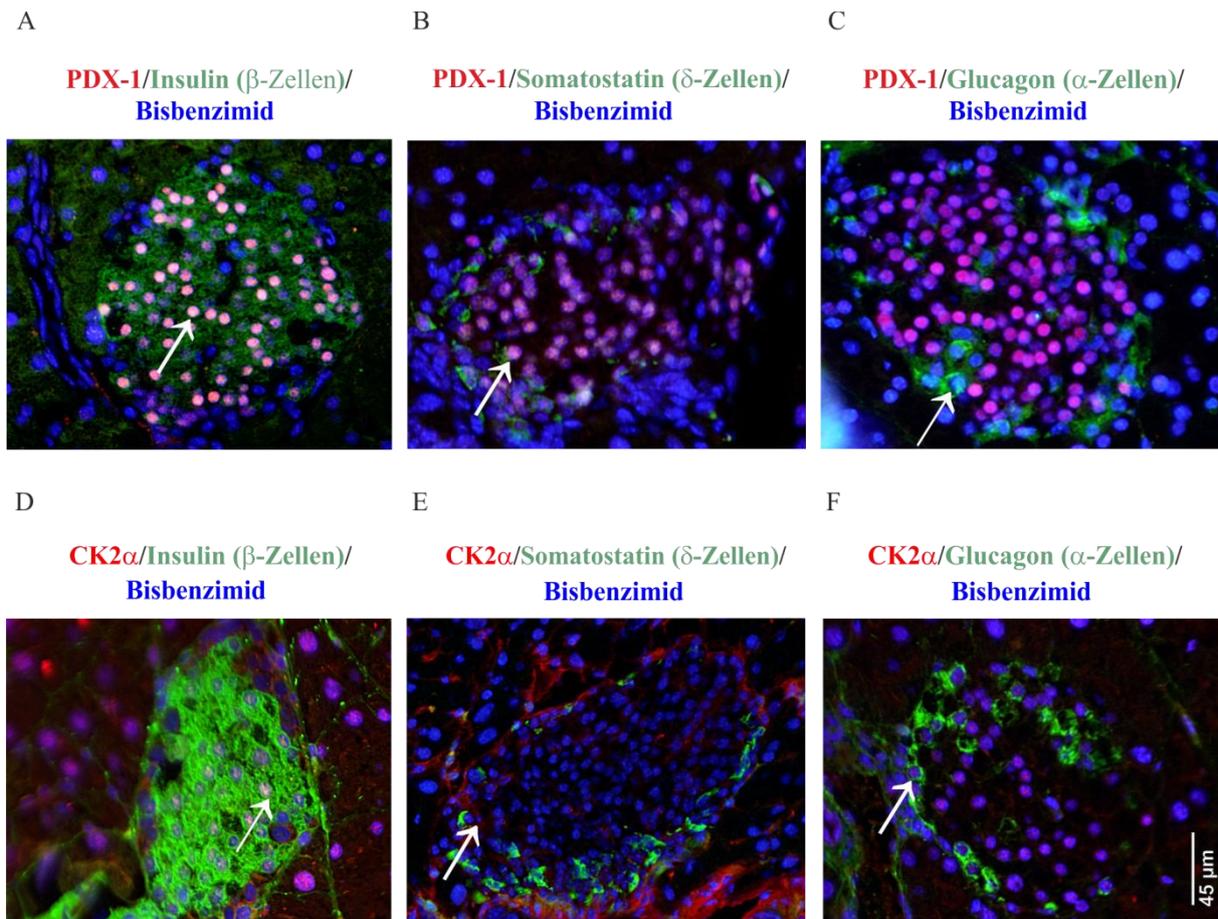


Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Färbung von PDX-1 (A-C) bzw. CK2 α (D-F) mit Insulin, Somatostatin und Glucagon als Inselzell-Marker in murinen Langerhansinseln. Murine Pankreas-Kryoschnitte wurden einer Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen PDX-1 (Kaninchen-Antiserum bzw. polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper) bzw. CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26 bzw. monoklonaler Maus-Antikörper 1A5), sowie Antikörpern gegen Insulin (polyklonaler Kaninchen-Antikörper), Somatostatin (polyklonaler Kaninchen-Antikörper #28) und Glucagon (monoklonaler Maus-Antikörper) als auch Bisbenzimid zur Darstellung der Zellkerne unterzogen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Cy3-, ein Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488-Antikörper bzw. ein Ziege-anti-Meerschweinchen-Alexa-FluorTM488-Antikörper verwendet. Die Pfeile zeigen jeweils die Insulin-positiven (A,D), Somatostatin-positiven (B, E) sowie die Glucagon-positiven (C,F) Zellen der Mausinsel an. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Keyence Biozero Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Vergrößerung: 40 x. Die Herstellung der Kryoschnitte sowie die Immunfluoreszenz-Färbung wurden von Janine Becker aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg durchgeführt.

Da aus der Immunfluoreszenz-Färbung von PDX-1 und CK2 α in den Langerhansinseln des Pankreas eine deutliche nukleäre Lokalisation beider Proteine in den β -Zellen hervorging, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Proteinkinase CK2 und der Transkriptionsfaktor PDX-1 in diesem Pankreas-Zelltyp colokalisiert vorliegen. Dies würde bedeuten, dass sich beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dazu wurden erneut Kryoschnitte muriner Langerhansinseln in einer Doppelfärbung gegen PDX-1 (polyklonaler Meer-

schweinchen-Antikörper) und CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26) bzw. CK2 α' (Kaninchen-Antiserum #30) gefärbt und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes auf deren subzelluläre Lokalisation in der Mausinsel hin untersucht. Zur Analyse der Colokalisation zweier Proteine muss sichergestellt sein, dass die beiden primären Antikörper aus 2 unterschiedlichen Spezies stammen. Die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 wurde mit einem polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper bestimmt, wohingegen zur Darstellung von CK2 α bzw. CK2 α' spezifische Kaninchen-Antiseren (Serum #26 für CK2 α und Serum #30 für CK2 α') benutzt wurden. Die verwendeten sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 und Ziege-anti-Meerschweinchen-Alexa-FluorTM488 gewährleisten zudem Emissionsspektren, welche weit genug voneinander entfernt liegen, sodass eine Colokalisation durch Übereinanderlegen der Fluoreszenzen für PDX-1 und CK2 visualisiert werden kann. In Abbildung 5 A ist klar zu erkennen, dass sowohl PDX-1 als auch CK2 α innerhalb der Langerhansinsel im Zellkern zu finden sind. Die Überlagerung beider Fluoreszenzen ist durch eine deutliche Rosa- bis Gelbfärbung der Zellkerne charakterisiert, was darauf hindeutet, dass PDX-1 und CK2 α in den pankreatischen β -Zellen colokalisiert vorliegen. Das gleiche Experiment wurde durchgeführt um festzustellen, ob PDX-1 auch mit CK2 α' zusammen in räumlicher Nähe auftritt, da nicht bekannt ist, in welcher Form die katalytischen Untereinheiten der CK2 in der Langerhansinsel der Maus vorkommen. In Abbildung 5 B ist neben der eindeutigen nukleären Lokalisation des PDX-1 ein ubiquitäres Vorkommen von CK2 α' sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma der Mausinsel darstellbar. Bei der Überlagerung der Bilder treten zudem vereinzelt rosa bis gelb gefärbte Zellkerne hervor, was dafür spricht, dass PDX-1 auch mit CK2 α' colokalisiert in der β -Zelle des Pankreas vorkommt, obgleich die Anzahl der Zellen, welche PDX-1 und CK2 α' -positiv sind, deutlich geringer ist als diejenigen, die PDX-1 und CK2 α colokalisiert aufweisen.

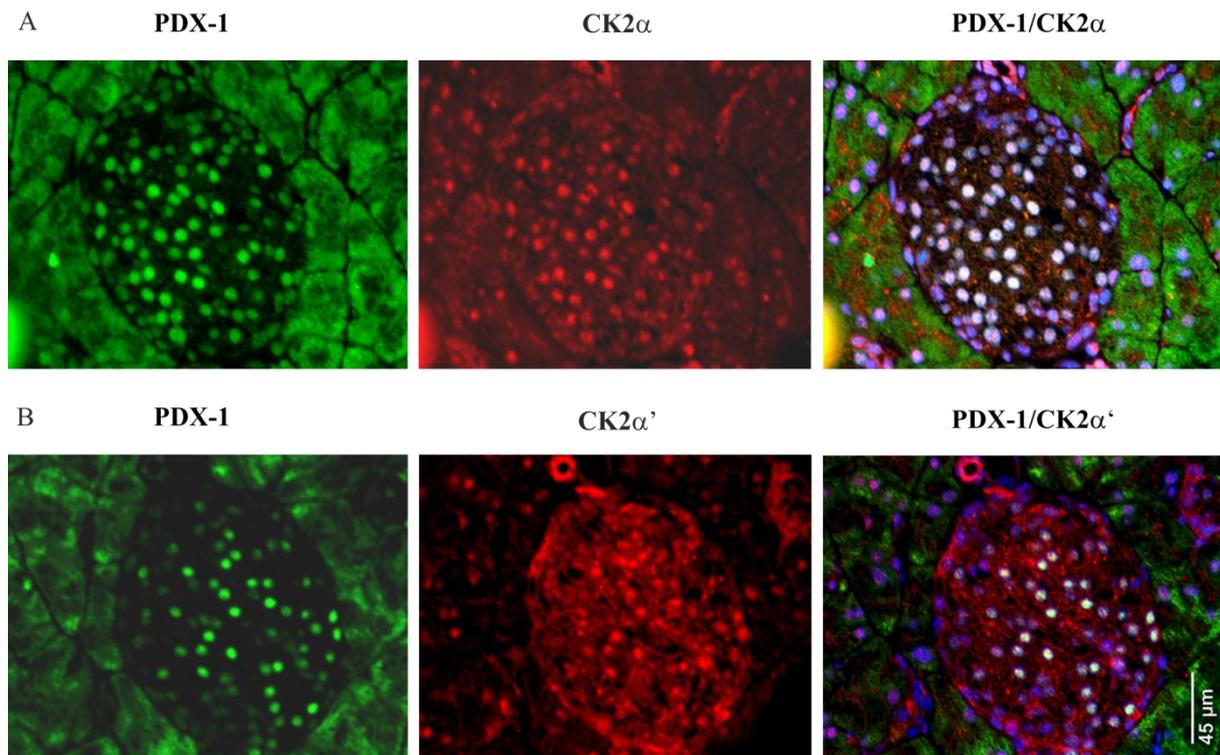
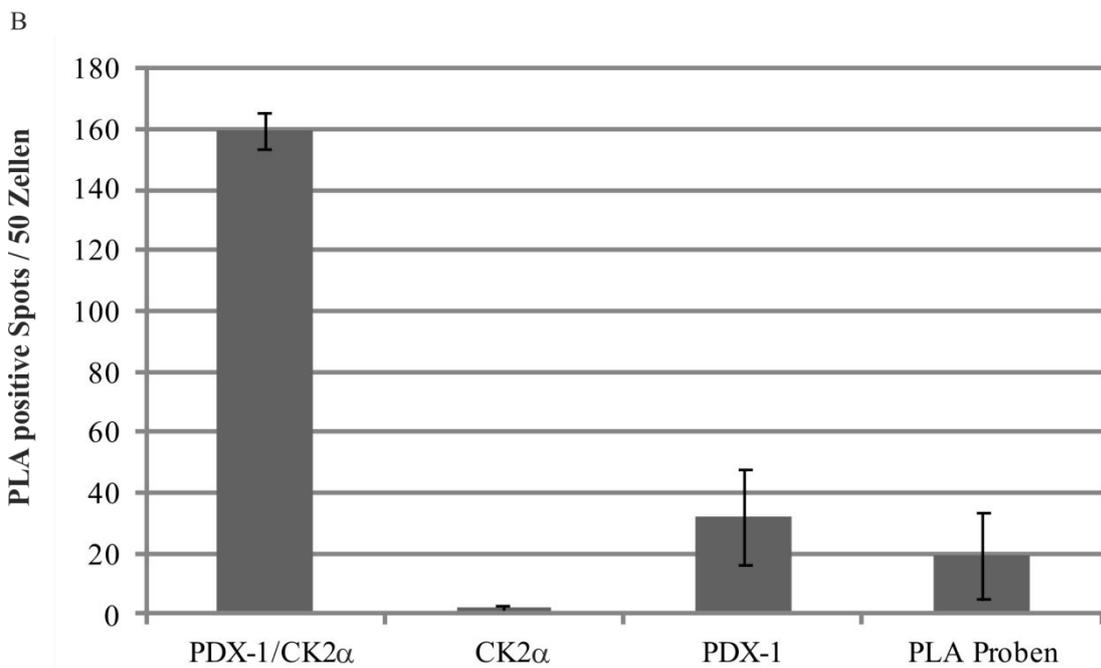
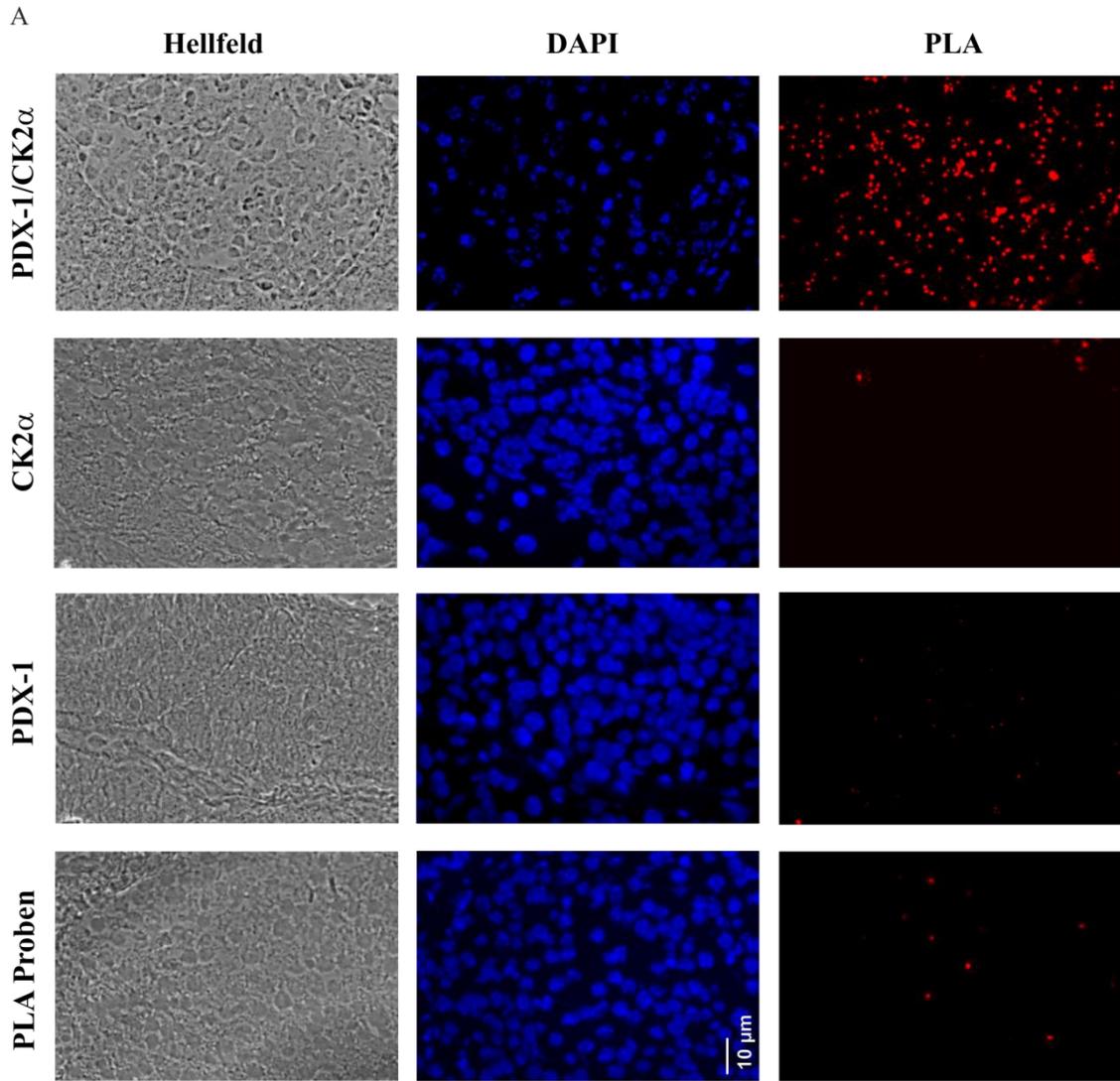


Abbildung 5: Colokalisation von PDX-1 mit CK2 α (A) bzw. CK2 α' (B) in Mausinseln. Kryoschnitte von adultem Mauspankreas wurden einer Doppelfärbung von PDX-1 (polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper) mit CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26) bzw. CK2 α' (Kaninchen-Antiserum #30) unterzogen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Cy3- und ein Ziege-anti-Meerschweinchen-Alexa-FluorTM488-Antikörper verwendet, sowie Bisbenzimid zur Darstellung der Zellkerne. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Keyence Biozero Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Vergrößerung: 40 x. Die Herstellung der Kryoschnitte sowie die Immunfluoreszenz-Färbung wurden von Janine Becker aus dem Institut der Klinisch-Experimentellen Chirurgie in Homburg durchgeführt.

Da in Abbildung 5 gezeigt werden konnte, dass sich PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 α' in der pankreatischen β -Zelle in räumlicher Nähe zueinander befinden stellt sich die Frage, ob es auch eine Assoziation beider Proteine in der Mausinsel gibt. Für die nachfolgenden Untersuchungen bezüglich der Assoziation von PDX-1 und CK2 im Mausmodell wurde lediglich die α -Untereinheit der CK2 in Betracht gezogen, da diese im Gegensatz zu CK2 α' laut den Ergebnissen in Abbildung 5 eindeutig colokalisiert mit PDX-1 vorliegt. Zur Analyse einer möglichen Komplexbildung von PDX-1 mit CK2 α wurde ein Duolink[®] *In Situ* "Proximity Ligation Assay" (PLA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung der Lokalisation sowie einer direkten Protein-Protein-Interaktion in den einzelnen Zellen. Diese Interaktion wird durch die Entstehung von Spots angezeigt, wobei ein Spot für eine Interaktion der jeweiligen Proteine in der Zelle steht. Hervorgerufen werden die Spots durch die Verwendung von Spezies-spezifischen sekundären Antikörpern, den PLA Proben, welche mit einem kurzen Oligonukleotid gekoppelt, komplementär zu der zweiten

verwendeten PLA Probe sind (Anti-Kaninchen PLUS und Anti-Maus MINUS). Befinden sich die beiden PLA Proben nach Bindung an die jeweiligen Primärantikörper in räumlicher Nähe zueinander, kommt es zur Interaktion und Verbindung der beiden Oligonukleotide, welche nach enzymatischer Verknüpfung mittels Fluoreszenzmikroskopie als Spot sichtbar gemacht werden kann. Für die Analyse einer möglichen Interaktion von PDX-1 mit CK2 α im Organismus wurden die Kryoschnitte muriner Langerhansinseln einer Doppelfärbung mit primären Antikörpern gegen PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) sowie zur Angabe der Spezifität mit den Einzelantikörpern gegen PDX-1 und CK2 α als auch lediglich mit den PLA Proben unterzogen. In Abbildung 6 A ist zu erkennen, dass bei der Doppelfärbung von PDX-1 und CK2 α eine Vielzahl von Spots innerhalb der Insel entstanden sind, welche für eine eindeutige Assoziation beider Proteine in der Langerhansinsel stehen. Im Vergleich dazu sind bei den Färbungen der einzelnen Antikörper und den PLA Proben nur wenige Spots sichtbar. Zur besseren Übersicht der mengenmäßigen Verteilung der Spots in den einzelnen Versuchsansätzen wurde zusätzlich die Spotanzahl in je 50 Zellen der Langerhansinseln ermittelt und graphisch in Abbildung 6 B abgebildet. Auch in dieser Darstellung des Experiments ist klar ersichtlich, dass die Spotanzahl in den Zellen, die mit PDX-1 und CK2 α gefärbt wurden, deutlich größer ist als die in den Kontrollansätzen der einzelnen Antikörper und den PLA Proben. Dieses Experiment ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es eine Assoziation von PDX-1 und CK2 α in den Inselzellen des Mauspankreas gibt.



6. Ergebnisse

Abbildung 6: Duolink® *In Situ* "Proximity Ligation Assay" (PLA) von PDX-1 und CK2 α in Mauseinseln.

(A) Kryoschnitte von adultem Mauspankreas wurden einer Doppelfärbung von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) mit CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) im Rahmen eines PLA unterzogen. Als Spezifitäts-Kontrolle wurde eine Färbung der Einzelantikörper sowie der PLA Proben mitgeführt. DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl). Die Herstellung der Kryoschnitte wurde von Janine Becker aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg durchgeführt. (B) Einzelne Spots in jeweils 50 Zellen der Versuchsansätze wurden ausgezählt und graphisch dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Auszählungen aller Versuchsansätze (Auszählung von zweimal 150 Zellen).

Zur Unterstützung der bisherigen Befunde über eine Assoziation von PDX-1 und CK2 α in murinen Langerhansinseln wurde zunächst geprüft, ob es möglich ist, die CK2-Untereinheiten biochemisch in einem Gesamtpankreas-Zelllysat zu identifizieren. Dazu wurden 50 μ g bzw. 100 μ g Zelllysat mit SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 12.5%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Western Blot Technik auf eine PVDF-Membran übertragen, welche dann mit spezifischen Antikörpern für die Untereinheiten der CK2 inkubiert wurden. Für den Nachweis von CK2 α wurde der monoklonale Maus-Antikörper 1A5 verwendet, das Kaninchen-Antiserum #30 weist CK2 α' nach und CK2 β kann mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 identifiziert werden. Als Ladekontrolle diente die zusätzliche Detektion von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A). Nach Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper) konnten die entstandenen Proteinbanden in einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht werden. In Abbildung 7 ist zu sehen, dass bereits 50 μ g pankreatisches Zelllysat ausreichend sind um eine deutliche Proteinbande für CK2 α zu zeigen, wohingegen CK2 α' und CK2 β erst in 100 μ g Zelllysat nachgewiesen werden können. Es wurde ebenfalls versucht, PDX-1 im Zelllysat biochemisch mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren, was jedoch nicht gelungen ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass für die Analyse Gesamtpankreas-Zelllysat verwendet wurde, bei dem der mengenmäßige Anteil an β -Zellen, in welchen PDX-1 ausschließlich vorkommt, weniger als 10% ausmacht [11]. Somit konnte PDX-1 im Gesamtpankreas-Zelllysat nicht gezeigt werden.

6. Ergebnisse

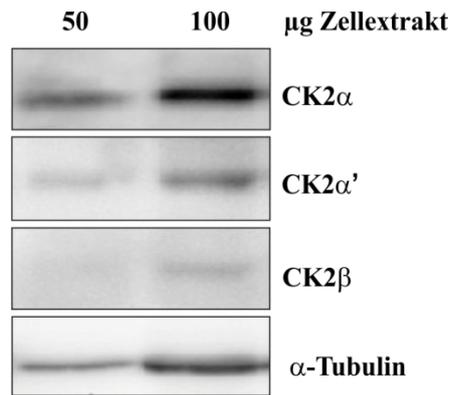


Abbildung 7: Biochemischer Nachweis der CK2-Untereinheiten im Gesamt-Zelllysate von murinem Pankreas. Fünfzig µg oder 100 µg Gesamtpankreas-Zelllysate wurden auf einem 12.5%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2α, dem Kaninchen-Antiserum #30 gegen CK2α', dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 gegen CK2β und dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α-Tubulin als Ladekontrolle versehen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht.

Nach dem erfolgreichen Nachweis aller CK2-Untereinheiten im Gesamtpankreas-Zelllysate wurde dieses im Folgenden dazu verwendet, eine Coimmunpräzipitation von PDX-1 mit CK2α durchzuführen, die eine mögliche Bindung beider Proteine anzeigt. Hierzu wurde Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 an eine Kombination aus Protein-A- und CL-4B-Sepharose gekoppelt und 2 Stunden mit 4 mg Gesamtpankreas-Zelllysate inkubiert, sodass im Zelllysate vorhandene Komplexe von PDX-1 und CK2α die Möglichkeit haben, sich an den PDX-1-Antikörper zu binden. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie Western Blot Analyse war es möglich, mit einem spezifischen Antikörper gegen CK2α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) eine Bindung an PDX-1 nachzuweisen. In Abbildung 8 ist das Ergebnis der Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2α mit den entsprechenden Kontrollen dargestellt (Input: 10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes, 100 µg Zellextrakt, Präzipitationskontrolle C (Zellextrakt mit Protein-A- und CL-4B-Sepharose ohne Präzipitation von PDX-1)). Das erhaltene Resultat ähnelt dem des PLA in den Langerhansinselschnitten. Im Immunpräzipitat ist im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Bande für CK2α zu erkennen, die durch eine Bande mit exakt der gleichen Größe im "Input" (IP) und Zellextrakt (ZE) als CK2α identifiziert werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Resultate, nach denen eine Bindung von CK2α und PDX-1 in murinem Pankreas vorliegt.

6. Ergebnisse

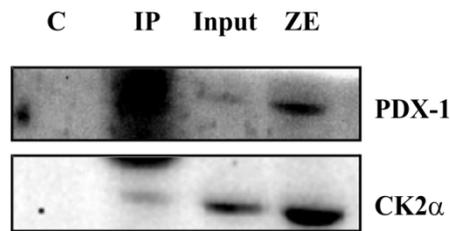


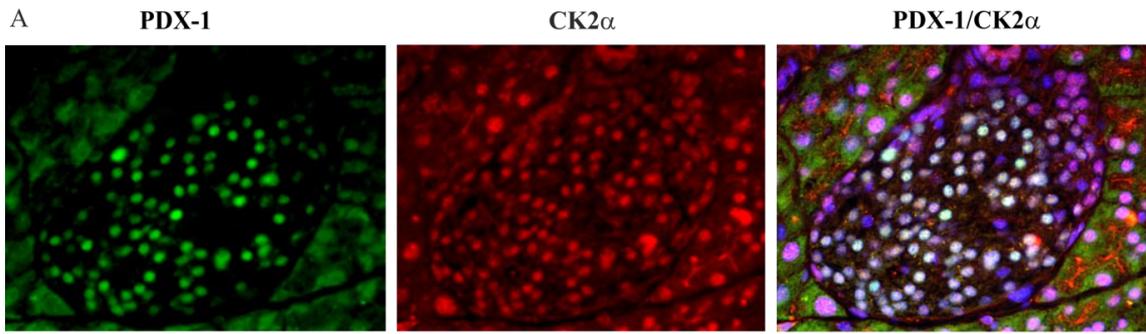
Abbildung 8: Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2 α in murinem Gesamtpankreas-Zellextrakt. Vier mg Gesamtpankreas-Zellextrakt wurden zusammen mit einem Gemisch aus Protein-A- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, 2 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (C: Zellextrakt mit CL-4B und Protein-A-Sepharose ohne Präzipitation von PDX-1) sowie dem "Input" (10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes) und einer Zellextrakt-Kontrolle (ZE, 100 μ g) auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Visualisierung von PDX-1 erfolgte mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone 267712 gegen PDX-1 und dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α sowie der nachfolgenden Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper) mithilfe des ECL Lumilight System. C: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, ZE: Zellextrakt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass PDX-1 als pankreatischer Transkriptionsfaktor einer Regulation durch Glucose unterliegt [44,119]. Nachdem zusätzlich eine Assoziation von PDX-1 und CK2 α unter physiologischen Bedingungen, das heißt in Langerhansinseln von Mäusen mit einem normalen Glucosegehalt, nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob diese Interaktion auch von Glucose beeinflusst wird. Dazu wurde 2 C57BL/6 Mäusen 40 Stunden lang Futter entzogen und nachfolgend der Blutglucosespiegel ermittelt. Dieser fiel bei beiden Mäusen nicht unter 75 mg/dl. Eine Maus wurde daraufhin durch die orale Gabe einer Hochglucoselösung (20% Glucoselösung, 10 μ l/g Körpergewicht, i.p.) einem Glucosestimulus ausgesetzt. Nach der Glucosegabe wurde in regelmäßigen Abständen der Blutglucosegehalt ermittelt, welcher bei 366 mg/dl lag. Sowohl der Glucosestimulierten als auch der fastenden Maus wurde im Anschluss das Pankreas entnommen, wovon Kryoschnitte angefertigt wurden. Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von PDX-1 (polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper), CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26) und CK2 α' (Kaninchen-Antiserum #30) durchgeführt. In Abbildung 9 A ist zu erkennen, dass die Inselfschnitte der Maus, welche 40 Stunden lang gefastet hat, eine nukleäre Lokalisation von PDX-1 und CK2 α zeigen. Die Colokalisation beider Proteine ist in der Überlagerung der Abbildungen durch eine deutliche Rosa- bis Gelbfärbung sichtbar. Die Inselfschnitte der Maus, die mit Hochglucose stimuliert wurden, zeigen dieselbe subzelluläre Lokalisation beider Proteine im Zellkern, was durch die gelbe Farbe verdeutlicht wird

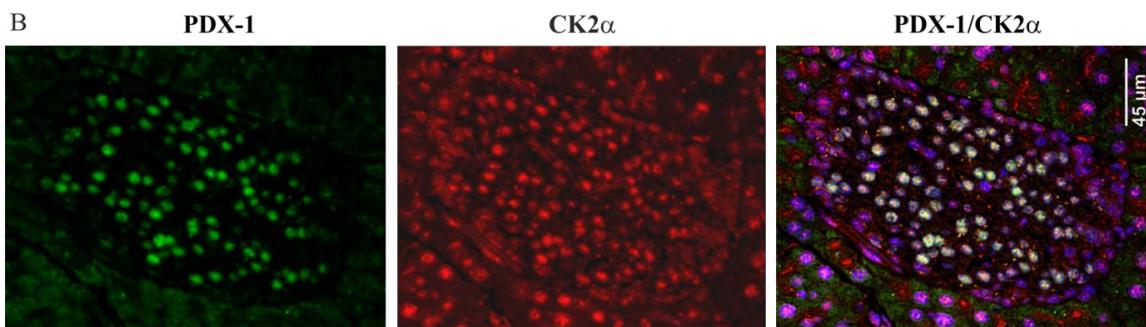
(Abbildung 9 B). Dasselbe Ergebnis tritt auch bezüglich der räumlichen Verteilung von PDX-1 und CK2 α' in den Inselechnitten der fastenden (Abbildung 9 C) und der Glucose-stimulierten Maus (Abbildung 9 D) auf. Somit wäre es möglich, dass die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 α' unabhängig von Glucose ist. Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass aufgrund der erhaltenen Ergebnisse das Mausmodell nicht das optimale Untersuchungssystem für die Fragestellung nach einem Glucoseeffekt auf die Interaktion von PDX-1 und CK2 ist. Die Tatsache, dass im lebenden Organismus viele Stoffwechselwege miteinander verknüpft sind, macht es schwierig, die Auswirkung eines einzigen Stoffwechselmetaboliten zu untersuchen. Vor allem die im intakten Organismus ablaufende Gluconeogenese, welche nach Glucoseentzug den Glucosegehalt der Zelle möglichst lange konstant hält, stellt einen limitierenden Faktor dar. Die weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 wurden aus diesen Gründen im Zellkultur-Modell fortgeführt.

6. Ergebnisse

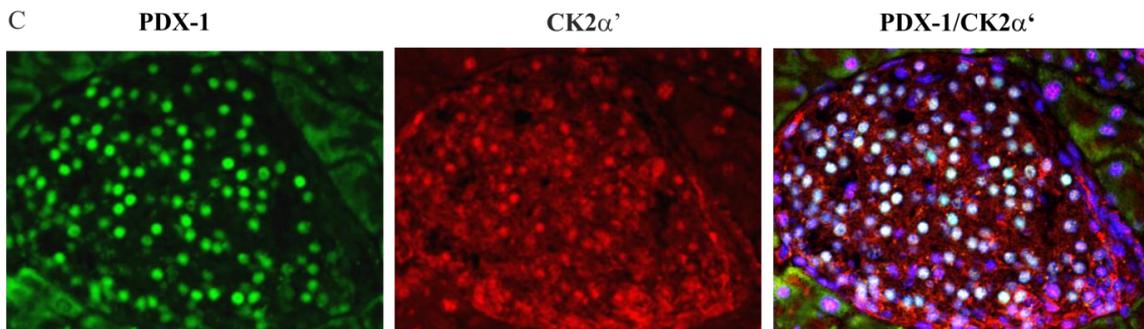
40 Glucoseentzug
75 mg/dl Glucose



Glucosestimulation
366 mg/dl Glucose



40 Stunden Glucoseentzug
75 mg/dl Glucose



Glucosestimulation
366 mg/dl Glucose

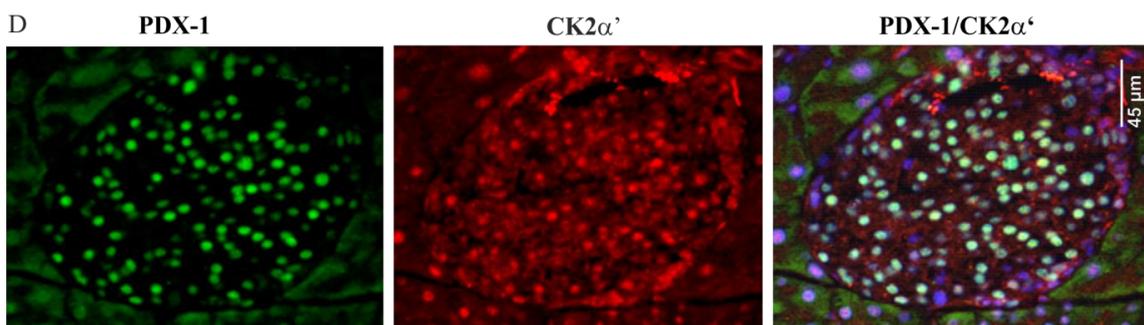


Abbildung 9: Colokalisation von PDX-1 mit CK2 α (A, B) bzw. CK2 α' (C, D) in Mausinseln unter Einfluss von Glucose. Zwei adulte C57BL/6 Mäuse wurden 40 Stunden gehungert mit anschließender Ermittlung des Blutglucosespiegels (circa 75 mg/dl). Eine Maus erhielt daraufhin einen oralen Glucosestimulus (20% Glucose-lösung, 10 μ l/g Körpergewicht, i.p.) bei gleichzeitiger Messung des Blutglucosespiegels. Nach Erreichen des Maximalwertes (366 mg/dl) wurden beiden Mäusen das Pankreas entnommen, wovon Kryoschnitte hergestellt wurden. Die Schnitte wurden einer Doppelfärbung von PDX-1 (polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper) mit CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26) bzw. CK2 α' (Kaninchen-Antiserum #30) unterzogen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Cy3- und ein Ziege-anti-Meerschweinchen-Alexa-FluorTM488-Antikörper verwendet sowie Bisbenzimid zur Darstellung der Zellkerne. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Keyence Biozero Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Vergrößerung: 40 x. Die Herstellung der Kryoschnitte sowie die Immunfluoreszenz-Färbung wurden von Janine Becker aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg durchgeführt.

6.2 Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 in MIN6-Zellen

Zur Analyse der Interaktion von PDX-1 und CK2 im Zellkultur-Modell wurden MIN-Zellen (Maus Insulinoma-Zellen) verwendet. Dabei handelt es sich um endokrine Zellen der Langerhansinseln eines murinen Pankreas, die aufgrund eines seltenen, gutartigen Tumors, dem Insulinom, vermehrt Insulin produzieren [79]. Um die Rolle von PDX-1 und CK2 für die Glucose-abhängige Insulinregulation zu analysieren, wurden im Folgenden der Einfluss von Glucose auf die Assoziation von PDX-1 und CK2 erforscht. Für diese Untersuchungen wurden die Glucose-responsiven MIN6 verwendet, um für die Interpretation der Ergebnisse den Langerhansinseln im lebenden Organismus so nahe wie möglich zu kommen. MIN6-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie in kleinen Zellverbänden, ähnlich den physiologischen pankreatischen Inseln, wachsen, wie in Abbildung 10 deutlich zu erkennen ist. Zum Wachstum benötigen sie DMEM-Medium mit 5.5 mM Glucose angereichert mit 15% FCS und 100 μ M β -Mercaptoethanol sowie eine Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂.

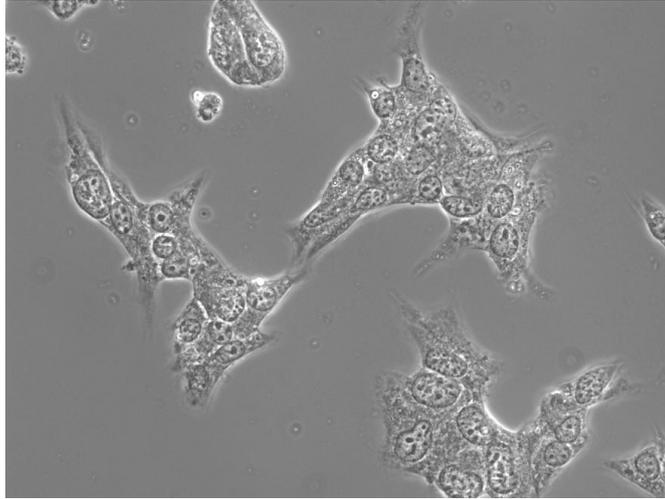


Abbildung 10: Phasenkontrastaufnahme von Glucose-responsiven MIN6-Zellen, die sich im Zellverband ähnlich kleiner pankreatischer Inseln angeordnet haben. Die Bilder wurden mit einem Axioskop Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl).

Zur Analyse eines Einflusses von Glucose auf die Menge an freigesetztem Insulin wurden die Zellen in Medium kultiviert, das außer Glucose alle anderen wichtigen Bestandteile für das Zellwachstum enthält. Nach einem solchen Glucoseentzug sind die Glucosereserven der Zellen soweit ausgeschöpft, dass sie auf einen Hochglucosestimulus von 25 mM hin mit der Freisetzung von Insulin reagieren. Das freigesetzte Insulin kann im Kulturüberstand mithilfe eines spezifischen ELISA-Tests nachgewiesen werden. Dazu wurden MIN6-Zellen 5 Stunden unter Glucosekarenz gehalten, bevor sie in einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden einem Stimulus von 25 mM Glucose ausgesetzt wurden. Der Mediumüberstand der behandelten Zellen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen und die darin enthaltene Insulinkonzentration mithilfe eines ELISA-Kits bestimmt. In Abbildung 11, in der das Ergebnis des ELISA graphisch dargestellt ist, ist zu erkennen, dass die Insulinkonzentration im Kulturmedium nach Hochglucosestimulation über den Zeitraum von 0 bis 24 Stunden stetig ansteigt. Dieses Ergebnis lässt auf die Funktionalität der MIN6-Zellen schließen, auf einen Glucosereiz hin Insulin zu produzieren.

6. Ergebnisse

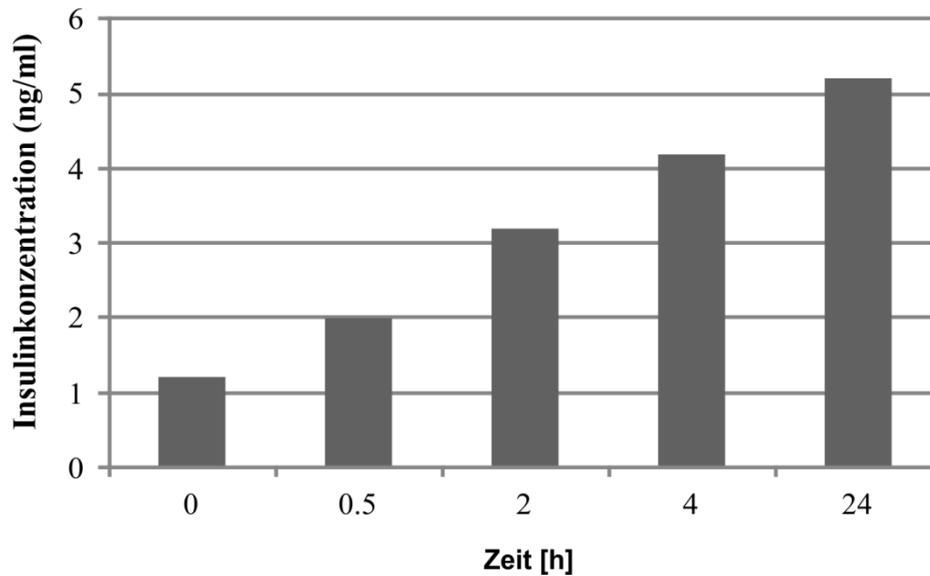


Abbildung 11: Insulinkonzentration in ng/ml ermittelt durch ELISA-Technik in Kulturmedium von MIN6-Zellen nach Glucosestimulation mit 25 mM Glucose in einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden. MIN6-Zellen wurden zum Glucoseentzug 5 Stunden in Medium ohne Glucose kultiviert, bevor ein Glucosestimulus von 25 mM Glucose zugeführt wurde. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde den Zellen Mediumproben entnommen, aus denen mittels eines ELISA-Kits die Insulinkonzentration in ng/ml ermittelt wurde.

Zur Analyse des Zusammenwirkens von PDX-1 und CK2 in den MIN6-Zellen ist es essentiell, zunächst das Vorhandensein sowie die subzelluläre Lokalisation der zu untersuchenden Proteine im Zellsystem zu ermitteln. Dazu wurde zuerst ein biochemischer Nachweis von PDX-1 und CK2 mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eines MIN6-Zellysates, Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Western Blot Technik, sowie anschließendem immunologischen Nachweis mithilfe Protein spezifischer Antikörper (PDX-1: Kaninchen-Antiserum, CK2 α : monoklonaler Maus-Antikörper 1A5, CK2 α' : Kaninchen-Antiserum #30, CK2 β : monoklonaler Maus-Antikörper 6D5 sowie α -Tubulin: monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) durchgeführt. In Abbildung 12 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt. Sowohl PDX-1 als auch alle CK2-Untereinheiten konnten in den Glucose-sensitiven MIN6-Zellen nachgewiesen werden.

6. Ergebnisse

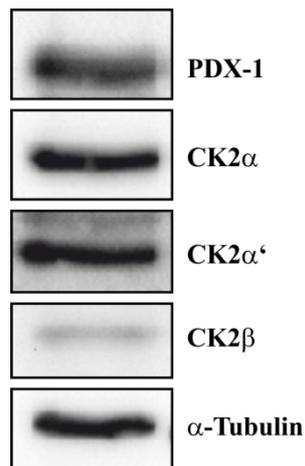


Abbildung 12: Biochemischer Nachweis von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in MIN6-Zellen. Fünfzig μ g eines MIN6-Zelllysates wurden auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse mit einem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 gegen CK2 α , dem Kaninchen-Antiserum #30 gegen CK2 α' dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 gegen CK2 β sowie dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α -Tubulin zur Ladekontrolle versehen. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht.

Nachdem das Vorhandensein von PDX-1 und den Untereinheiten der CK2 in den MIN6-Zellen geklärt war, wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Lokalisation der Proteine in MIN6-Zellen untersucht, da eine mögliche Interaktion beider Proteine davon abhängt, ob sich die Proteine zur gleichen Zeit am gleichen Ort befinden. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach dem Anwachsen fixiert, sodass eine immunologische Färbung von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten mit spezifischen Antikörpern möglich war. PDX-1 sowie CK2 α , CK2 α' und CK2 β konnten mit spezifischen Kaninchen-Seren nachgewiesen werden (Antiserum gegen PDX-1, Serum #26 für CK2 α , Serum #30 für CK2 α' und Serum #269 für CK2 β). Nach Einsatz eines fluoreszenzgekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594-Antikörpers und Kernfärbung mit DAPI war mittels Immunfluoreszenz-Technik somit ein Rückschluss auf das subzelluläre Vorkommen der Proteine möglich. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass PDX-1 hauptsächlich im Zellkern der MIN6-Zellen vorkommt, was vor allem in der Überlagerung der Rotfluoreszenz von PDX-1 mit der blauen Kernfärbung durch DAPI in einer pinkfarbenen Kernfärbung resultiert. CK2 α und CK2 α' scheinen ubiquitär in der pankreatischen Zelle lokalisiert zu sein, was in der Überlagerung mit DAPI gezeigt wird, wobei pinkfarbene Zellkerne in rotem Cytoplasma zu erkennen sind. CK2 β befindet sich hauptsächlich im Cytoplasma von MIN6-Zellen. Aus diesem Experiment kann gefolgert werden, dass CK2 α und CK2 α' in den pankreatischen

β -Zellen im gleichen Zellkompartiment wie PDX-1 lokalisiert sind, wodurch eine Interaktion beider Proteine denkbar wäre. Für die β -Untereinheit der CK2 gilt dies nur beschränkt, da nur ein geringer Teil des Proteins im Zellkern lokalisiert ist.

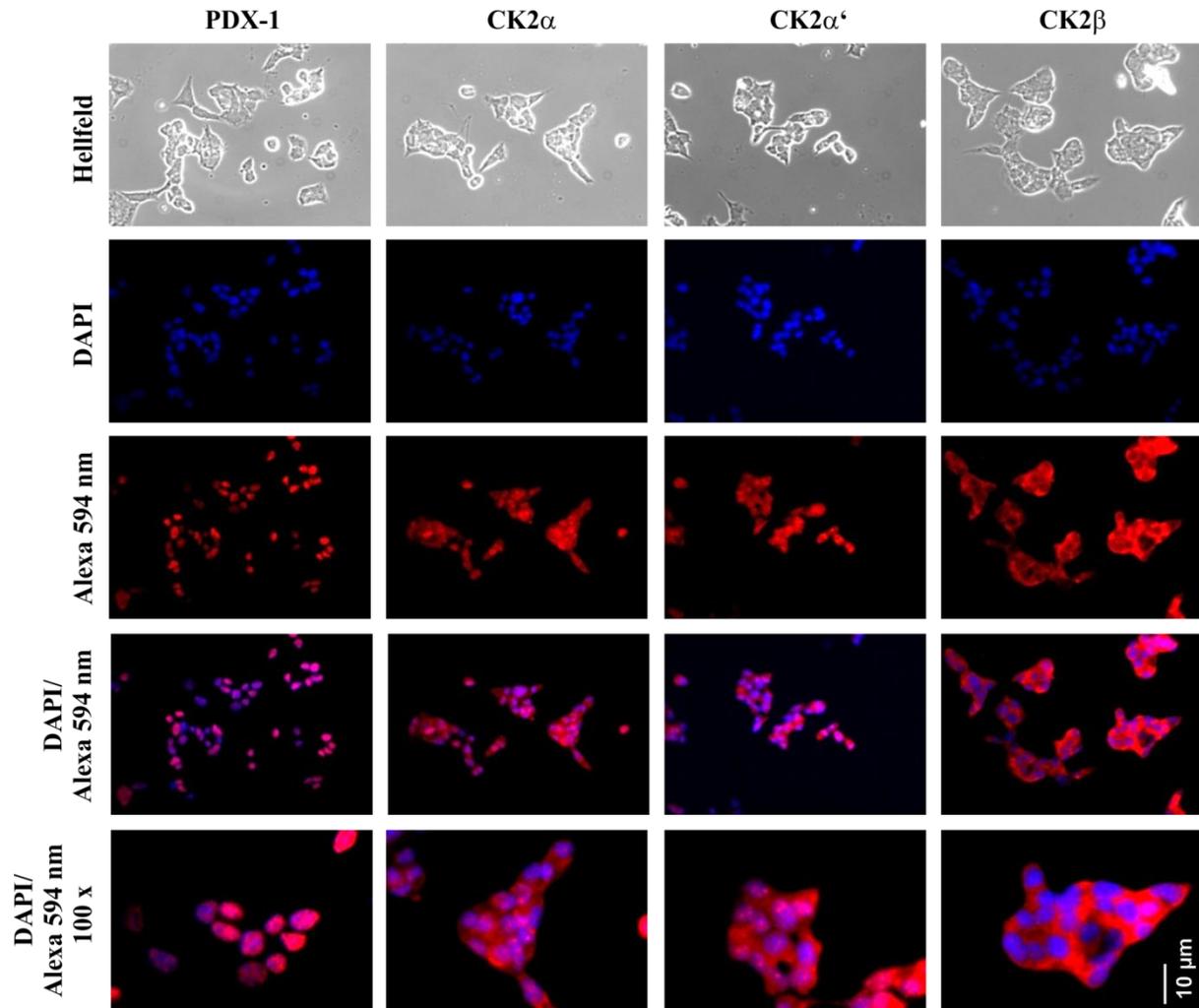


Abbildung 13: Subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und den Untereinheiten der CK2 in MIN6-Zellen.

Fixierte MIN6-Zellen auf Deckgläschen wurden mit Kaninchen-Antisera gegen PDX-1 sowie CK2 α (Serum #26), CK2 α' (Serum #30) und CK2 β (Serum #269) gefärbt. Als sekundärer Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594-Antikörper verwendet, sowie eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl und 100 x Öl).

Nachdem die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und CK2 in MIN6-Zellen entschlüsselt war, galt es als nächstes experimentell festzustellen, ob es eine Auswirkung von Glucose auf die Expression oder Funktionalität der einzelnen Proteine gibt, da in der Literatur Daten vorhanden sind, die zeigen, dass PDX-1 Glucose-abhängig reguliert wird [14,44,54,70,73,102,119,120,151,171]. Dazu wurde den Zellen 8 Stunden Glucose entzogen, bevor sie mit verschiedenen Glucosekonzentrationen von 0 mM bis 25 mM in einem Zeitraum

von 0.5 bis 24 Stunden behandelt wurden. Nach Herstellung von Zellextrakten, Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie Western Blot Technik wurde ein immunologischer Nachweis mit spezifischen Antikörpern, welche PDX-1 bzw. die einzelnen CK2-Untereinheiten erkennen (PDX-1: Kaninchen-Antiserum, Kaninchen-Antiserum gegen CK2 α (#26), CK2 α' (#30) und CK2 β (#269)), durchgeführt. Die Inkubation mit Antikörpern für PDX-1, CK2 β und α -Tubulin erfolgte nacheinander. Lediglich die Detektion von CK2 α und CK2 α' wurde mit 2 spezifischen Antikörpern in einem Ansatz durchgeführt, da die Proteine wegen ihres geringen Größenabstand von 2 kDa auf einem 12.5%-SDS-Polyacrylamidgel nicht getrennt voneinander dargestellt werden können. Nach enzymatischem Sichtbarmachen der Proteine ist ein Rückschluss auf deren Expression unter den verschiedenen Glucosekonzentrationen im Vergleich mit α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) als Ladekontrolle möglich. Die Expression von α -Tubulin lässt auf die geladene Proteinmenge schließen. Für die Ergebnisdarstellung wurde beispielhaft das Resultat des Glucoseeinflusses nach 4 Stunden Behandlung ausgewählt. Abbildung 14 zeigt, dass die Proteinmenge von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten im Vergleich zu α -Tubulin nach Zugabe der einzelnen Glucosekonzentrationen annähernd ähnlich bleibt.

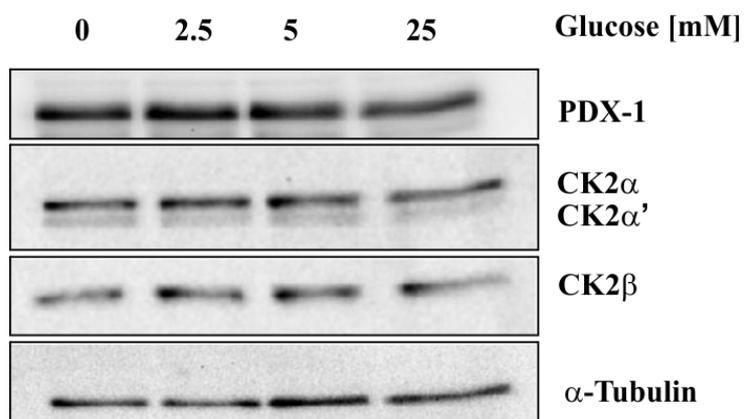


Abbildung 14: Expression von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in MIN6-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Glucosekonzentrationen. Nach achtstündigem Glucoseentzug wurden MIN6-Zellen mit 0 mM, 2.5 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und 4 Stunden danach geerntet. Nach Herstellung von Zelllysaten wurden jeweils 50 μ g Gesamtprotein auf einem 12.5%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Western Blot Analyse mit einem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, dem Kaninchen-Antiserum #26 gegen CK2 α , dem Kaninchen-Antiserum #30 gegen CK2 α' , dem Kaninchen-Antiserum #269 gegen CK2 β sowie dem monoklonalen Maus-Antikörper clone DM1A gegen α -Tubulin zur Ladekontrolle inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Meerrettich-Peroxidase Antikörper eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mit dem ECL Lumilight System sichtbar gemacht.

6. Ergebnisse

Zur Analyse der Expression wurden die Proteinbanden für PDX-1 und der Untereinheiten der CK2 densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) ausgewertet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 15 wiedergegeben. Die Proteinmenge von PDX-1 und CK2 ist hierbei auf die Expression von α -Tubulin genormt und zusätzlich bezogen auf 0 mM Glucose dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es nach Quantifizierung der Expression deutliche Schwankungen der Proteinmenge für PDX-1 und den CK2-Untereinheiten gibt. Nach Berücksichtigung der Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Unterschiede der Proteinexpression nach Behandlung mit den jeweiligen Glucose-konzentrationen nicht signifikant sind. Aus diesem Grund scheint Glucose keinen eindeutigen Einfluss auf die Expression von PDX-1 und CK2 zu haben.

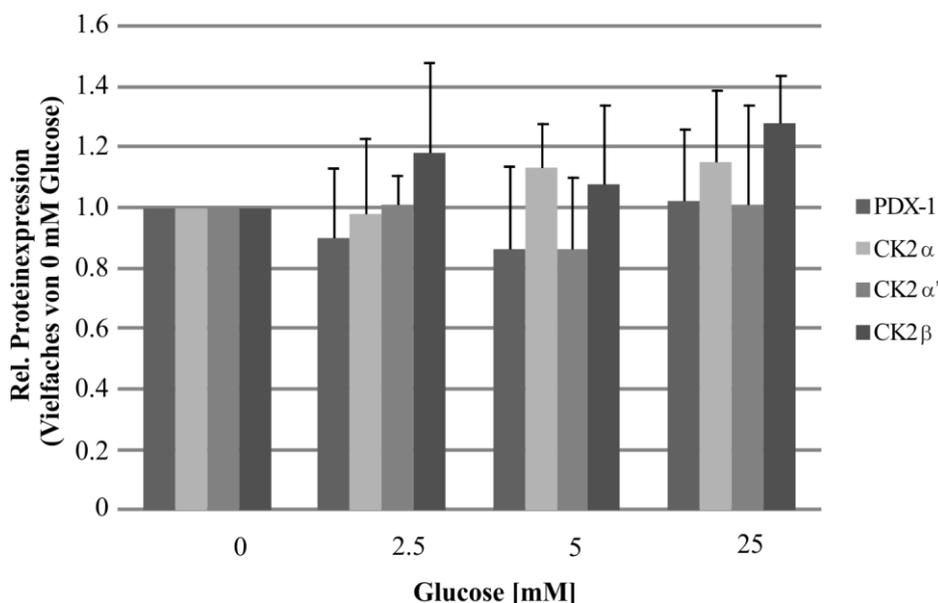


Abbildung 15: Quantifizierung der Proteinexpression von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in MIN6-Zellen nach Zugabe verschiedener Glucosekonzentrationen. Die Proteinexpressionen von PDX-1 und den 3 Untereinheiten der CK2 wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und spezifischen Antikörpern ermittelt und die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) sowie im Vergleich zu α -Tubulin quantifiziert. Die Intensität der Proteinbanden unter 0 mM Glucose wurden als Referenz (1.0) herangezogen. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Da sich die Expression von PDX-1 und CK2 als unabhängig von der Glucosekonzentration erwiesen hat, wäre eine weitere Regulationsmöglichkeit der Einfluss von Glucose auf die Aktivität der Proteinkinase. Um dies zu testen wurden MIN6-Zellen erneut nach achtstündiger

6. Ergebnisse

Glucosekonzentrationen von 0 mM bis 25 mM für einen Zeitraum von 0.5 bis 24 Stunden ausgesetzt. Nach Zellernte und Herstellung von Zellextrakten wurden diese für die Durchführung eines CK2-Aktivitätsassays verwendet. Dabei wird ein synthetisches Peptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD von der CK2 mithilfe von [32 P]- γ -ATP (10 μ Ci/500 μ l [32 P]- γ -ATP) im Zellextrakt phosphoryliert. Die Phosphatinkorporationsrate der einzelnen Proben kann mittels Messung der Čerenkov-Strahlung in einem Szintillationszähler ermittelt werden, die ein Maß für die Aktivität der CK2 darstellt. Auch hier wurde die vierstündige Behandlung der Zellen mit einzelnen Glucosekonzentrationen für die Darstellung ausgewählt, wobei die übrigen Behandlungszeiträume die gleiche Tendenz bezüglich der CK2-Aktivität aufweisen. Das Ergebnis ist in dem Balkendiagramm in Abbildung 16 mit den Aktivitäten aus 3 unabhängigen Experimenten prozentual dargestellt, auf 0 mM Glucose bezogen sowie auf gleiche CK2-Proteinmengen normiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass es eine signifikante Aktivitätssteigerung der CK2 bei 2.5 mM und 5 mM Glucose im Vergleich zu 0 mM Glucose gibt. Dieser Effekt scheint bei Hochglucosestimulation mit 25 mM nach 4 Stunden Behandlung wieder rückläufig zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Glucose einen Effekt auf die Aktivität der CK2 hat.

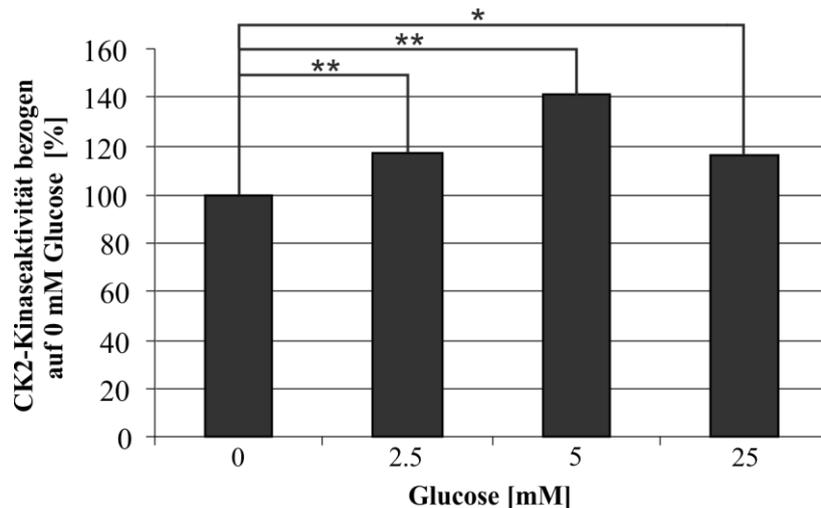


Abbildung 16: CK2-Aktivitätsassay von MIN6-Zellen unter Einfluss von Glucose. MIN6-Zellen wurden einer vierstündigen Behandlung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen von 0 mM bis 25 mM Glucose unterzogen. Nach Herstellung von Zellysaten wurde der Einfluss von Glucose auf die Aktivität der im Zellextrakt enthaltenen CK2 mithilfe eines spezifischen Aktivitätsassays bestimmt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Signifikanz wurde mithilfe des "Student's t-Test" bezogen auf 0 mM Glucose bestimmt, wobei * signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $P < 0.05$ und ** signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $P < 0.01$ ist.

Die Proteinkinase CK2 kommt in ihrer aktiven Form in den meisten Fällen als Holoenzym, bestehend aus 2 katalytischen CK2 α - oder CK2 α' - und 2 nicht katalytischen CK2 β -Untereinheiten, vor. Um die Funktionalität der CK2 als Holoenzym in Abhängigkeit von Glucose zu untersuchen, wurde eine Coimmunpräzipitation von CK2 α und CK2 β nach Behandlung mit 25 mM Glucose in einem Zeitraum von 0.5 bis 24 Stunden durchgeführt. Da die Glucosestimulation die Bildung von Insulin in den β -Zellen des Pankreas zur Folge hat und weil zwischen einem Glucose- oder Insulin-abhängigen Effekt unterschieden werden muss, wurde in einem parallelen Experiment die potentielle Wirkung von 100 nM Insulin auf die mengenmäßige Verteilung der CK2-Untereinheiten analysiert. Die behandelten Zellen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten geerntet und nach Herstellung von Zellextrakten wurde ein Gemisch von Protein-A- und CL-4B-Sepharose, präzipitiert mit dem Kaninchen-Antiserum #26 gegen CK2 α , mit den jeweiligen Zellextrakten für 2 Stunde inkubiert. Nach Elution der präzipitierten Proteine mit SDS-Probenpuffer und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran präzipitierte CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und copräzipitierte CK2 β (monoklonaler Maus-Antikörper 6D5) mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. In Abbildung 17 A ist erkennbar, dass sowohl bei den mit 100 nM Insulin behandelten Zellen als auch bei den mit 25 mM Glucose inkubierten Zellen zu allen Zeitpunkten etwa gleiche Mengen der präzipitierten CK2 α -Untereinheit sowie der copräzipitierten CK2 β im Vergleich zu der Präzipitationskontrolle nachzuweisen sind. Um genauere Rückschlüsse auf die mengenmäßige Verteilung von CK2 α und CK2 β nach Insulin- und Glucosebehandlung zu bekommen, wurden die erhaltenen Proteinbanden von CK2 β in 2 unabhängigen Experimenten densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) ausgewertet und nach Normierung auf die jeweilige Menge an CK2 α quantitativ in einem Balkendiagramm dargestellt, welches in Abbildung 17 B gezeigt ist. Nach dieser quantitativen Analyse der CK2 β -Expression, bezogen auf CK2 α -Präzipitation, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der CK2 β -Expression unter Einfluss von Insulin oder Glucose zwischen 0.5 und 24 Stunden Behandlung.

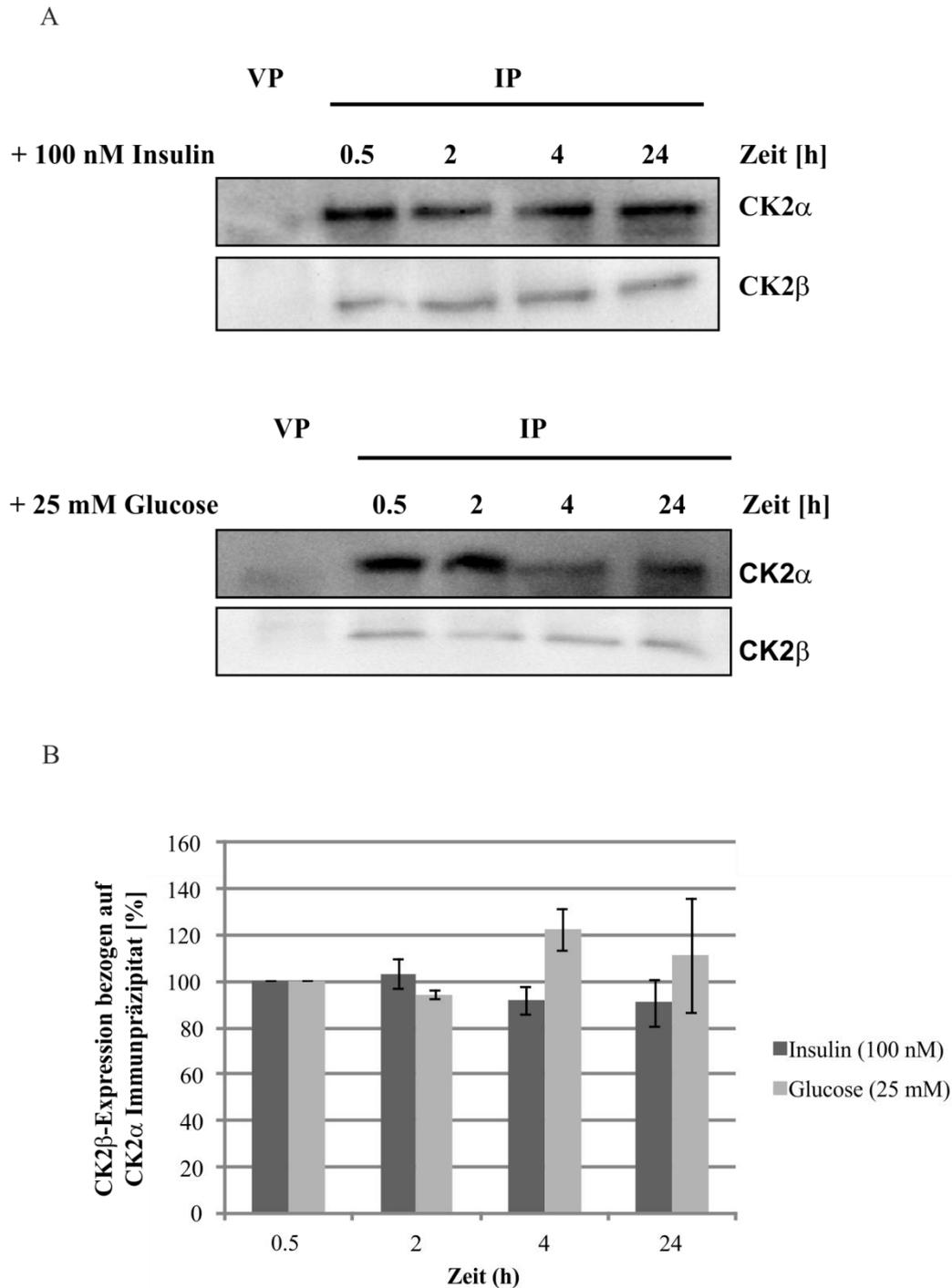


Abbildung 17: Coimmunpräzipitation von CK2 α und CK2 β unter Einfluss von Insulin und Glucose in einem Zeitrahmen von 0.5 bis 24 Stunden. (A) Nach Behandlung von MIN6-Zellen mit 100 nM Insulin oder 25 mM Glucose wurden die entsprechenden Zellextrakte (170 μ g bzw. 200 μ g) mit einem Gemisch von Protein-A- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen CK2 α , 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (Vorpräzipitat = VP) auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Darstellung von CK2 α erfolgt mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und CK2 β wird mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 nachgewiesen. Eine Visualisierung der präzipitierten bzw. copräzipitierten Proteine erfolgt nach Inkubation mit einem Ziege-Anti-Maus-IgG-

6. Ergebnisse

Meerrettich-Peroxidase Antikörper sowie enzymatischem Nachweis mittels dem ECL Lumilight System. (B) Die Proteinexpressionsdaten von CK2 β nach Behandlung mit Insulin und Glucose zu den jeweiligen Zeitpunkten aus 2 unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erfasst, auf die jeweilige Menge an präzipitierter CK2 α normiert und in einem Balkendiagramm bezogen auf den 0.5 Stunden Wert prozentual dargestellt.

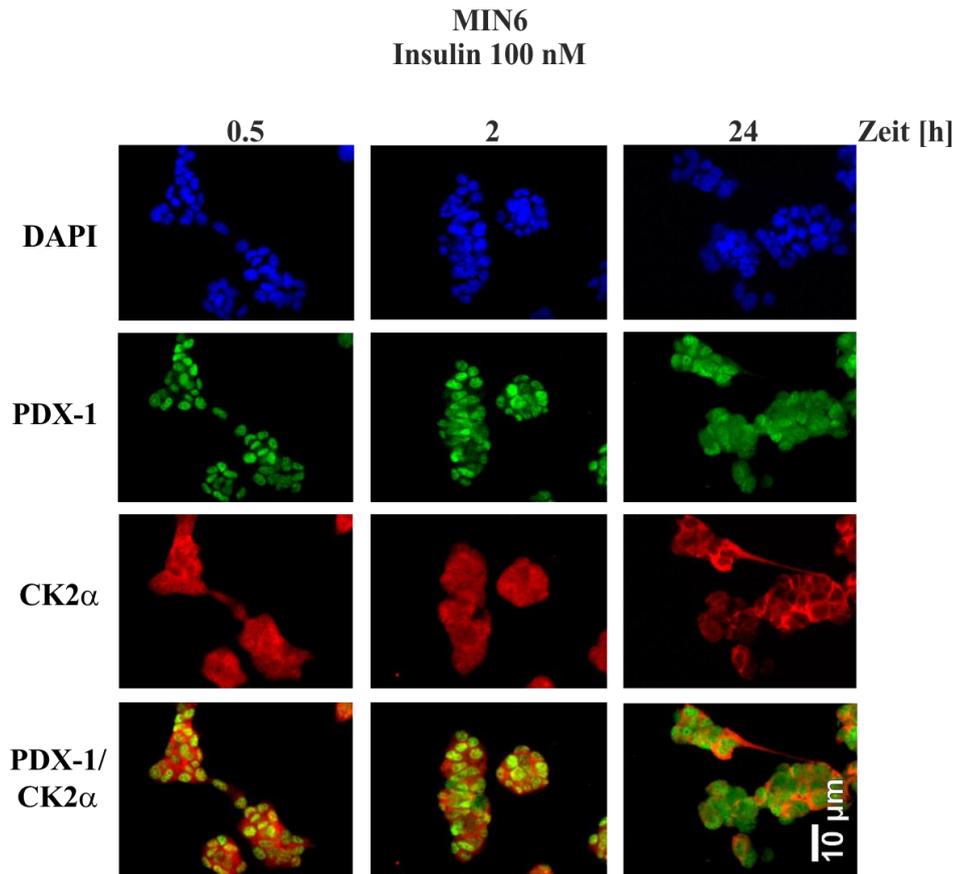
Bislang konnte gezeigt werden, dass Glucose die Aktivität der CK2 steigert, ohne dass sich die Proteinmengen der CK2-Untereinheiten verändern. Weder Glucose noch Insulin, als alternativer Stimulus, haben Auswirkungen auf die Menge der CK2-Untereinheiten. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich als nächstes die Frage, welchen Einfluss Glucose auf die bereits in primären Mausinseln gezeigte Interaktion zwischen CK2 und PDX-1 ausübt. In der Literatur gibt es kontroverse Berichte über die Glucose-abhängige Lokalisation von PDX-1. Docherty *et al.* und Macfarlane *et al.* haben gezeigt, dass PDX-1 auf einen Glucosestimulus hin vom Cytoplasma der pankreatischen β -Zelle in den Zellkern wandert [44,119], um dort seinen Aufgaben als pankreatischer Transkriptionsfaktor spezifischer Zielgene, wie GLUT2 oder Glucokinase, jedoch vor allem der Initiation der Insulingentranskription im Zusammenspiel mit einer Reihe weiterer Cofaktoren, nachzugehen [159,219,223]. Moede *et al.* konnten diese Translokation von PDX-1 auf einen Glucosestimulus hin nicht nachweisen [146]. Mosley *et al.* haben eine perinukleäre Lokalisation von PDX-1 unter Niedrigglucosebedingungen beschrieben [149,151]. Daher musste zuerst geklärt werden, ob es tatsächlich eine Lokalisationsänderung für PDX-1 unter Glucoseeinfluss gibt. Im Zuge dieser Untersuchungen kann dann analysiert werden, ob CK2 eine Änderung der subzellulären Lokalisation unter Glucoseeinfluss erfährt. Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit mit dem Titel "Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase CK2 und dem Transkriptionsfaktor PDX-1 - Neue Ansätze zur Regulation des Insulinmetabolismus und der Glucosehomöostase" aus dem Jahr 2011 wurde ein erstes Experiment zu dieser Fragestellung durchgeführt. MIN6-Zellen auf Deckgläschen wurden für 8 Stunden einer Glucosekarenz ausgesetzt um nachfolgend unter 0 mM Glucose weiter gehungert zu werden oder einen Hochglucosestimulus von 25 mM Glucose zu erhalten. Die Zellen wurden 0.5, 2 und 24 Stunden nach Glucosezugabe fixiert und mit spezifischen Antikörpern für PDX-1 und den CK2-Untereinheiten gefärbt. Betreffend der Frage nach einem Glucoseeinfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und den Untereinheiten der CK2 konnten folgende Aussagen getroffen werden: Diejenigen Zellen, welche nach dem Glucoseentzug weiterhin unter 0 mM Glucose kultiviert wurden, wiesen eine hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation von PDX-1 zu allen Zeitpunkten auf. Nur vereinzelt waren Zellkerne zu finden,

in denen PDX-1 zu sehen war. Die CK2-Untereinheiten CK2 α , CK2 α' und CK2 β hingegen waren bei 0 mM Glucose sowohl nach 0.5 Stunden, als auch nach 2 und 24 Stunden hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert. Da bereits ein Versuch bezüglich der subzellulären Lokalisation von PDX-1 und CK2 unter physiologischen 5 mM Glucose ohne vorherige Glucosekarenz vorliegt (siehe Abbildung 13), bei dem PDX-1 im Zellkern, CK2 α und CK2 α' ubiquitär in der Zelle und CK2 β im Cytoplasma zu finden sind, scheint sich die Lokalisation für PDX-1 und CK2 α durch den Glucoseentzug zugunsten des Cytoplasmas verändert zu haben. Die Zellen, welche nach dem Glucoseentzug unter 25 mM Glucose kultiviert wurden, wiesen bezüglich der Lokalisation von PDX-1 nach 0.5 Stunden Behandlung bereits ein weitgehend nukleäres Vorkommen auf und zu den Zeitpunkten 2 und 24 Stunden war das Protein ausschließlich im Zellkern zu finden. Der in der Literatur bereits beschriebene Shuttle von PDX-1 vom Cytoplasma in den Zellkern [44,119] konnte somit bestätigt werden. Eine weitere Aussage, die aus dem beschriebenen Experiment getroffen werden konnte, war, dass sowohl die CK2 α - und CK2 α' als auch die CK2 β -Untereinheit 0.5 und 2 Stunden nach dem Hochglucosestimulus von 25 mM noch im Cytoplasma lokalisiert waren. Nach 24 Stunden Behandlung mit 25 mM Glucose hat sich die subzelluläre Lokalisation jedoch vollständig zum Zellkern hin verschoben. Somit scheint Glucose nicht nur einen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 zu haben, sondern ebenfalls bei den CK2-Untereinheiten eine Lokalisationsänderung hervorzurufen. Die Überlagerung der Signale für PDX-1 und der CK2-Untereinheiten nach Hochglucosestimulation zeigte, dass PDX-1 nach 2 Stunden Behandlung bereits vollständig im Kern lokalisiert war, wohingegen die CK2-Untereinheiten noch cytoplasmatisch zu finden waren. Vierundzwanzig Stunden nach Behandlung fand man eine gemeinsame Lokalisation von PDX-1 und den Untereinheiten der CK2 im Zellkern. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass CK2 nicht mit PDX-1 zusammen, sondern zeitversetzt zu PDX-1 durch den Glucosestimulus vom Cytoplasma in den Zellkern wandert [225,226].

Da ein solcher Glucosestimulus als physiologischer Reiz für eine Regulation der CK2 zuvor noch nicht beschrieben wurde, galt es im Rahmen meiner Dissertation als nächstes zu analysieren, ob dabei tatsächlich Glucose und nicht etwa das durch Glucose freigesetzte Insulin der Urheber dieser Translokationsänderung ist. Dazu wurden MIN6-Zellen auf Deckgläschen für 8 Stunden einer Glucosekarenz ausgesetzt, um nachfolgend einen Insulinstimulus von 100 nM zu erhalten. Die Zellen wurden 0.5, 2 und 24 Stunden nach Insulinzugabe fixiert und mit spezifischen Antikörpern für PDX-1 und CK2 gefärbt. Zum Nachweis von PDX-1 wurde der monoklonale Maus-Antikörper clone 267712 verwendet,

CK2 α wurde mit dem Kaninchen-Antiserum #26 detektiert und der Nachweis der CK2 β -Untereinheit erfolgte mit dem Kaninchen-Antiserum #269. Nach Inkubation mit den sekundären Antikörpern Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488 sowie Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594 und einer abschließenden Färbung der Zellkerne mit DAPI wurde die Lokalisation der Proteine mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Wie Abbildung 18 zeigt, befindet sich PDX-1 sowohl nach 0.5 Stunden als auch nach 2 und 24 Stunden ausschließlich im Kern der Zellen. CK2 α ist in der Zelle über den Zeitpunkt von 0.5 Stunden bis 24 Stunden ubiquitär verteilt (Abbildung 18 A), CK2 β hingegen ist ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 18 B). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale ergibt für die Colokalisation von PDX-1 und CK2 α eine gelbe Farbe im Zellkern. Im Vergleich mit dem in der Diplomarbeit durchgeführten Versuch, bei dem PDX-1 und die CK2-Untereinheiten nach Glucosekarenz im Cytoplasma der Zelle lokalisiert waren, kann bestätigt werden, dass die Translokation der CK2-Untereinheiten ein Glucose-abhängiger Effekt ist. Unter Zugabe von 100 nM Insulin ändert sich die subzelluläre Lokalisation der CK2 nicht. Was PDX-1 betrifft, ändert sich das zelluläre Vorkommen des Proteins nach Insulinzugabe ebenso nicht. PDX-1 ist bereits zu Beginn der Zeitreihe im Zellkern lokalisiert. Eine Glucosestimulation hingegen führt zur Wanderung des Proteins innerhalb von 2 Stunden vom Cytoplasma in den Nukleus der Zelle. Somit lässt sich aus diesen Experimenten keine eindeutige Schlussfolgerung für oder gegen eine Insulin-abhängige Translokation des Proteins treffen.

A



B

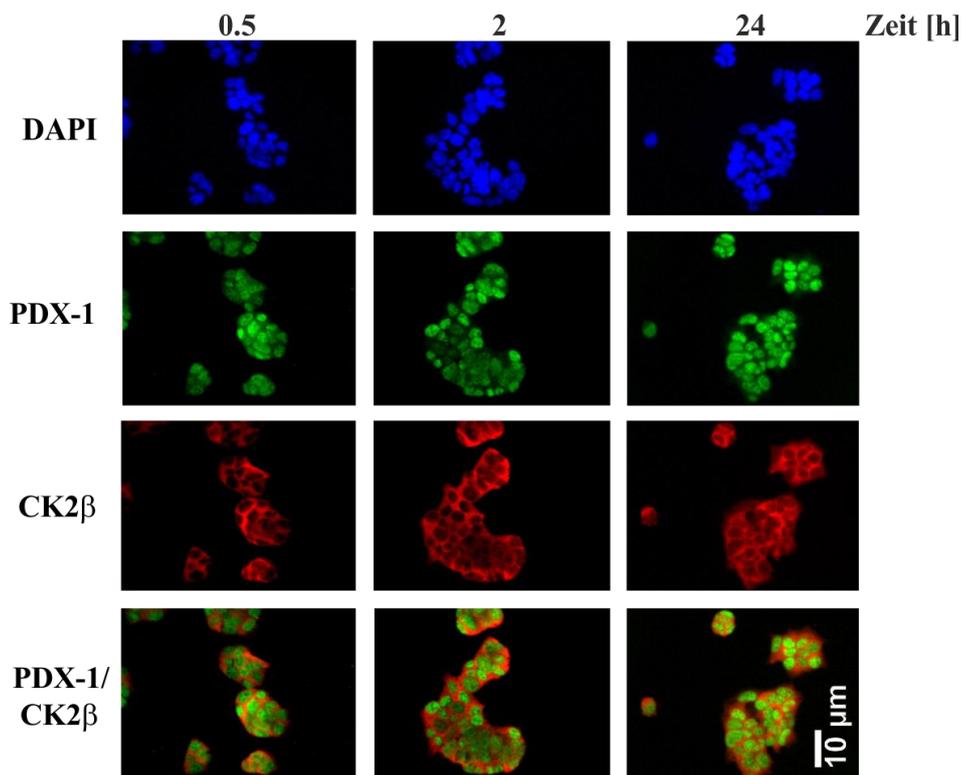
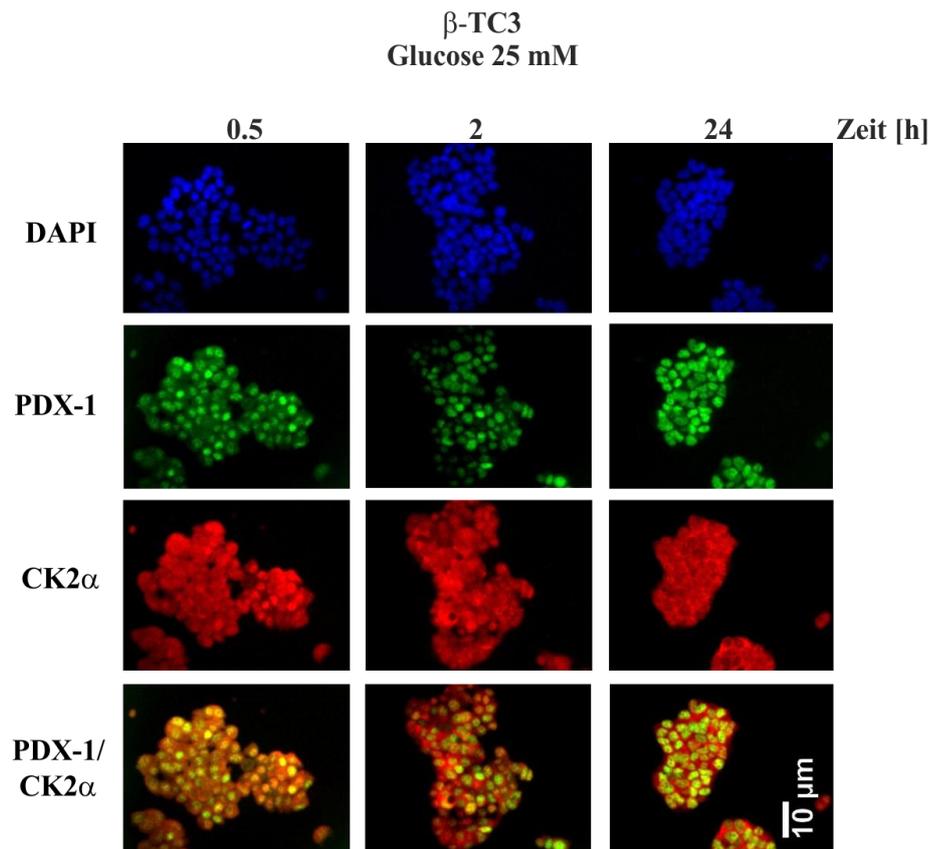


Abbildung 18: Colokalisation von PDX-1 mit CK2 α (A) bzw. CK2 β (B) nach Zugabe von Insulin in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden nach achtstündigem Glucoseentzug mit 100 nM Insulin behandelt. Nach 0,5, 2 und 24 Stunden wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert sowie immunologisch mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen PDX-1 sowie Kaninchen-Antiseren gegen CK2 α (Serum #26) und CK2 β (Serum #269) gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488-Antikörper sowie ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594-Antikörper verwendet als auch eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und CK2 wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss analysiert. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl).

In einer weiteren Versuchsreihe analog zu dem Experiment aus Abbildung 18 wurde getestet, in wie weit sich ein Glucosestimulus von 25 mM auf die Verteilung von PDX-1 und CK2 α (Abbildung 19 A) bzw. CK2 β (Abbildung 19 B) in nicht Glucose-sensitiven β -TC3-Zellen auswirkt. PDX-1 ist trotz achtstündiger Glucosekarenz in den β -TC3-Zellen im Zeitraum von 0,5 Stunden bis 24 Stunden ausschließlich im Kern der Zellen lokalisiert. CK2 α weist ein sowohl cytoplasmatisches als auch nukleäres Vorkommen auf, CK2 β ist nach Zugabe von 25 mM Glucose im Versuchszeitraum ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Weder für PDX-1, noch für die CK2-Untereinheiten konnte in den nicht Glucose-sensitiven pankreatischen β -Zellen eine Änderung der Lokalisation innerhalb des Untersuchungszeitraums festgestellt werden. Im Vergleich zu den früheren Experimenten, in denen eine Translokationsänderung der CK2-Untereinheiten nach Glucosestimulation festgestellt werden konnte, lässt sich aus diesem Versuch schließen, dass die Translokation von CK2 ausschließlich auf Glucose-sensitive pankreatische β -Zellen beschränkt ist. In wie weit diese Aussage auch für PDX-1 gilt, kann nicht eindeutig geklärt werden. PDX-1 ändert zwar zwischen 0,5 und 24 Stunden seinen Lokalisation in β -TC3-Zellen nach Glucosestimulation nicht, ist jedoch im Vergleich zu dem Experiment aus der Diplomarbeit bereits 0,5 Stunden nach Glucosezugabe im Zellkern vorzufinden.

A



B

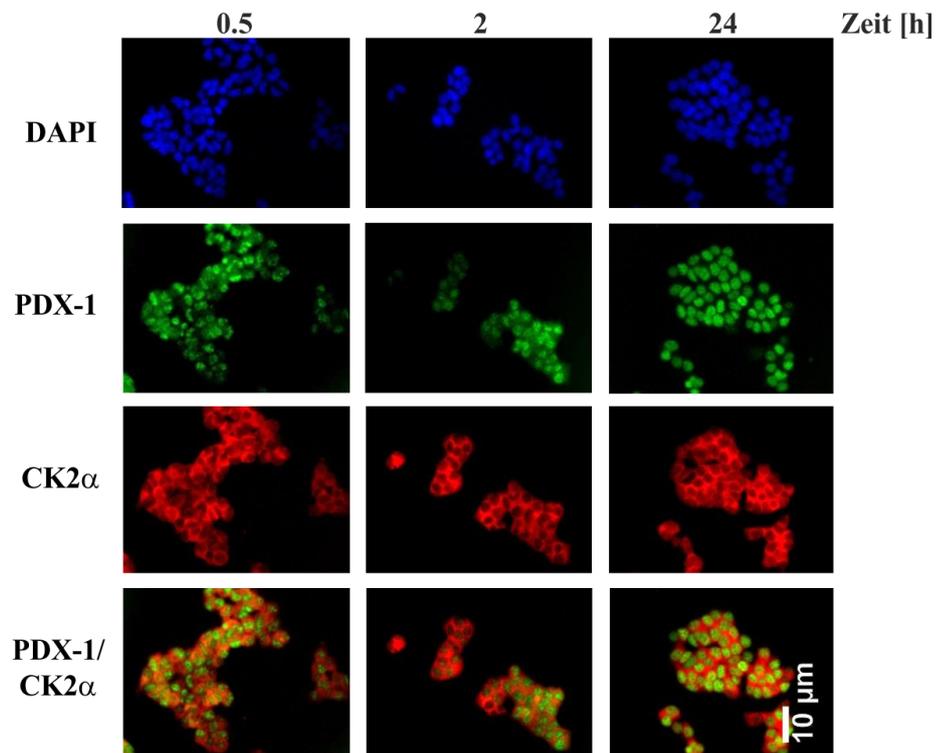


Abbildung 19: Colokalisation von PDX-1 mit CK2 α (A) bzw. CK2 β (B) unter Hochglucosestimulation in nicht Glucose-sensitiven β -TC3 Zellen. β -TC3-Zellen wurden nach achtstündigem Glucoseentzug einem Hochglucosestimulus von 25 mM Glucose ausgesetzt. Nach 0,5, 2 und 24 Stunden wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert sowie immunologisch mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen PDX-1 sowie Kaninchen-Antiseren gegen CK2 α (Serum #26) und CK2 β (Serum #269) gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Maus-Alexa-FluorTM488-Antikörper sowie ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594-Antikörper verwendet als auch eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und CK2 wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss analysiert. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl).

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass PDX-1 und CK2 unter Glucoseeinfluss eine Lokalisationsänderung vom Cytoplasma in den Zellkern der pankreatischen β -Zelle vollziehen. Da Meng *et al.* bereits herausgefunden haben, dass PDX-1 durch CK2 phosphoryliert wird [139] war es eine naheliegende Frage, ob die Phosphorylierung von PDX-1 durch CK2 einen Einfluss auf dessen subzelluläre Lokalisation unter Glucoseeinfluss hat.

Um einen Einfluss der CK2-Phosphorylierung von PDX-1 experimentell zu analysieren, können 2 unterschiedliche Strategien angewandt werden. Zum einen kann mit PDX-1-Phosphorylierungsmutanten gearbeitet werden, wobei die von der CK2 phosphorylierten Aminosäuren Threonin an Position 231 und Serin an Position 232 mittels ortgerichteter Mutagenese durch nicht phosphorylierbare Alanine ersetzt wurden (PDX-1_{T231A/S232A}). Des Weiteren gibt es eine Reihe von CK2-spezifischen Inhibitoren, welche in Form von ATP-kompetitiver Inhibition die Funktion der CK2 in der Zelle einschränken. Zu Beginn der Dissertation galten Quinalizarin [35] und TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol) [82] als spezifische Inhibitoren für die CK2, im Laufe der Zeit wurden diese jedoch von CX-4945 (Silmitasertib) [129,174,198] abgelöst, welches bereits in klinischen Studien eingesetzt wird [4,15,173]. Um zu testen, in wie weit die beschriebenen CK2-Inhibitoren in den verwendeten MIN6-Zellen die Aktivität der CK2 beeinflussen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit den jeweiligen Hemmstoffen in entsprechender Konzentration (Quinalizarin: 50 μ M, TBB: 50 μ M, CX-4945: 10 μ M) bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Zellernte und Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils 30 μ g der Proben dem bereits auf Seite 20 beschriebenen Kinaseaktivitätstest, welcher spezifisch für die CK2 ist, ausgesetzt. In Abbildung 20 ist das Resultat der CK2-Hemmung mit den beschriebenen Inhibitoren im Vergleich zu DMSO als Lösungsmittelkontrolle gezeigt. Aus dem Experiment kann gefolgert werden, dass alle Inhibitoren in der eingesetzten Menge eine deutliche Aktivitätsminderung der CK2 auf mindestens 50% Restaktivität zeigen, mit kleinen Unterschieden betreffend der

6. Ergebnisse

eingesetzten Konzentration und dem Ausmaß der Inhibition. CX-4945 hat den Vorteil, dass es im Vergleich zu Quinalizarin und TBB in geringerer Menge eingesetzt werden kann und damit den größten Effekt bezüglich der CK2-Aktivitätsminderung besitzt. Deshalb wurde nach Erscheinen dieses sehr spezifischen Inhibitors präferentiell bei Analysen bezüglich der Hemmung der Kinaseaktivität der CK2 mit CX-4945 gearbeitet. Da alle aufgeführten Inhibitoren nach dem gleichen Prinzip als ATP-Kompetitoren wirken und in der eingesetzten Menge eine deutliche Reduktion der CK2-Aktivität zeigen, werden sie von vielen Arbeitsgruppen zur CK2-Hemmung eingesetzt [49,78,108,164,181,186,203,227].

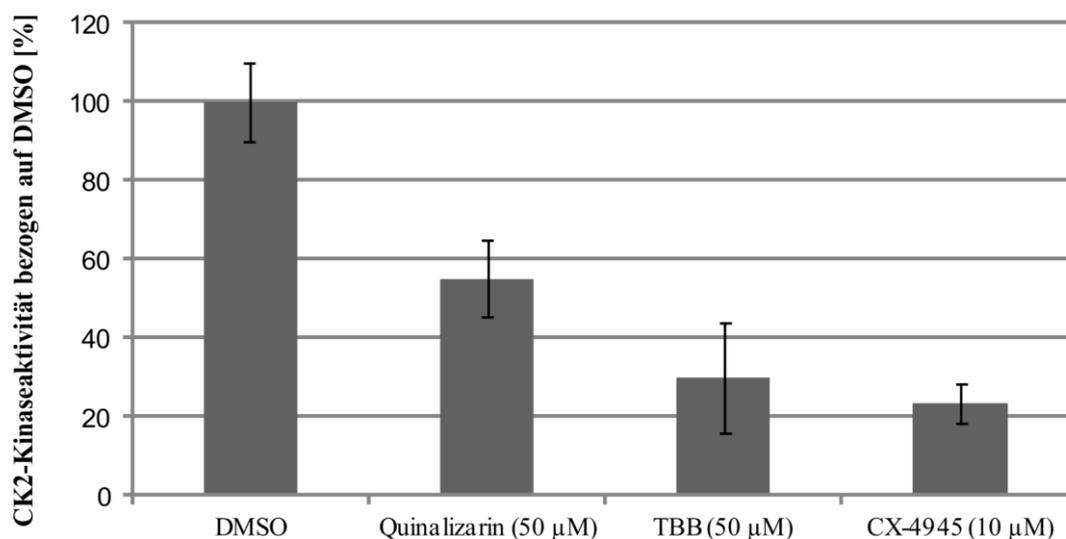


Abbildung 20: CK2-Aktivitätsassay von MIN6-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen CK2-Inhibitoren. MIN6-Zellen wurden mit 50 µM Quinalizarin, 50 µM TBB und 10 µM CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach Herstellung von Zellysaten wurde die Aktivität der im Zellextrakt enthaltenen CK2 mithilfe eines spezifischen Aktivitätsassays bestimmt. Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten dar im Vergleich zu DMSO.

Zur Analyse, ob die Phosphorylierung von PDX-1 durch CK2 einen Einfluss auf deren subzelluläre Lokalisation unter Glucose hat, wurde ebenfalls bereits in meiner Diplomarbeit ein Experiment durchgeführt, das eine Antwort auf diese Frage liefert. MIN6-Zellen wurden auf Deckgläschen nach achtstündigem Glucoseentzug mit 0 mM oder 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Behandlung mit 50 µM des CK2-Hemmstoffes TBB kultiviert. Die behandelten Zellen wurden nach 0,5, 2, 4 und 24 Stunden fixiert und mit Antikörpern gegen PDX-1 und den CK2-Untereinheiten inkubiert. Nach Analyse der Versuchsansätze mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops konnte gezeigt werden, dass die Zellen, welche mit 0 mM Glucose und dem CK2-Hemmstoff behandelt wurden, bezüglich der subzellulären Lokalisation von

PDX-1 und CK2 α ein hauptsächlich cytoplasmatisches Vorkommen der Proteine aufwiesen. Nach Zugabe von 25 mM Glucose bei gleichzeitiger CK2-Inhibition mit TBB war zu erkennen, dass PDX-1 nach 2 Stunden Behandlung größtenteils im Zellkern der pankreatischen β -Zelle auftrat und nach 4 bzw. 24 Stunden seine Lokalisation vollständig zum Zellkern hin verschoben hatte. Für die subzelluläre Lokalisation der CK2 zeigte sich, dass eine halbe bis 2 Stunden nach dem Stimulus die CK2-Untereinheiten überwiegend im Cytoplasma der Zelle vorlagen und nach 4 und 24 Stunden eine Translokation in den Zellkern vollzogen hatten, wobei sie colokalisiert mit PDX-1 waren. Da das Resultat dieses Versuches das gleiche ist, wie nach alleiniger Glucosebehandlung gehungerter MIN6-Zellen, scheint die CK2-Inhibition durch TBB keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 zu haben.

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl PDX-1 als auch CK2 unter Einfluss von Glucose zeitversetzt vom Cytoplasma in den Zellkern wandern und dort colokalisiert vorkommen, wurde untersucht, ob die beiden Proteine unter diesen Bedingungen im Zellkern auch aneinander binden. Dazu wurde eine Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2 α bzw. PDX-1 und CK2 β unter 5 mM und 25 mM Glucose durchgeführt. Hierzu wurden MIN6-Zellen 5 Stunden in Medium ohne Glucose kultiviert, bevor sie weitere 4 Stunden mit 5 mM bzw. 25 mM Glucose behandelt wurden. Nach der Herstellung der jeweiligen Zellextrakte wurden je 4 mg Gesamtproteine mit einer Kombination aus Protein-A- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, für 2 Stunden inkubiert, sodass im Zellextrakt vorhandene Komplexe von PDX-1 und CK2 α bzw. PDX-1 und CK2 β die Möglichkeit haben, an den PDX-1-Antikörper zu binden. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit den entsprechenden Kontrollen (Input (10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes), 100 μ g Zellextrakt, Präzipitationskontrolle (Zellextrakt mit Protein-A- und CL-4B-Sepharose ohne Präzipitation von PDX-1)) sowie Western Blot Analyse ist es möglich, die mit PDX-1 copräzipitierten Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und CK2 β (monoklonaler Maus-Antikörper 6D5) nachzuweisen. In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Coimmunpräzipitation dargestellt. Im "Input" sowie in der Zellextrakt-Kontrolle sind die CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten nachweisbar. In der Immunpräzipitationsspur ist im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Bande für CK2 α nach Behandlung mit 25 mM Glucose erkennbar, unter 5 mM ist diese nur sehr schwach vorhanden. Für CK2 β kann weder nach Zugabe von 5 mM noch unter 25 mM Glucose ein copräzipitiertes Protein nachgewiesen

werden, auch nicht nach dreißigminütiger Exposition der Membran. Somit kann festgehalten werden, dass in MIN6-Zellen nach Stimulation mit Hochglucose CK2 α an PDX-1 bindet.

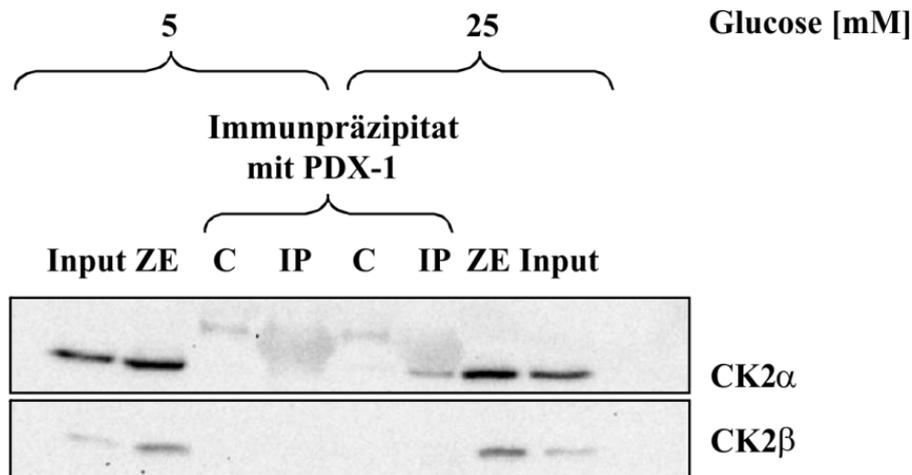


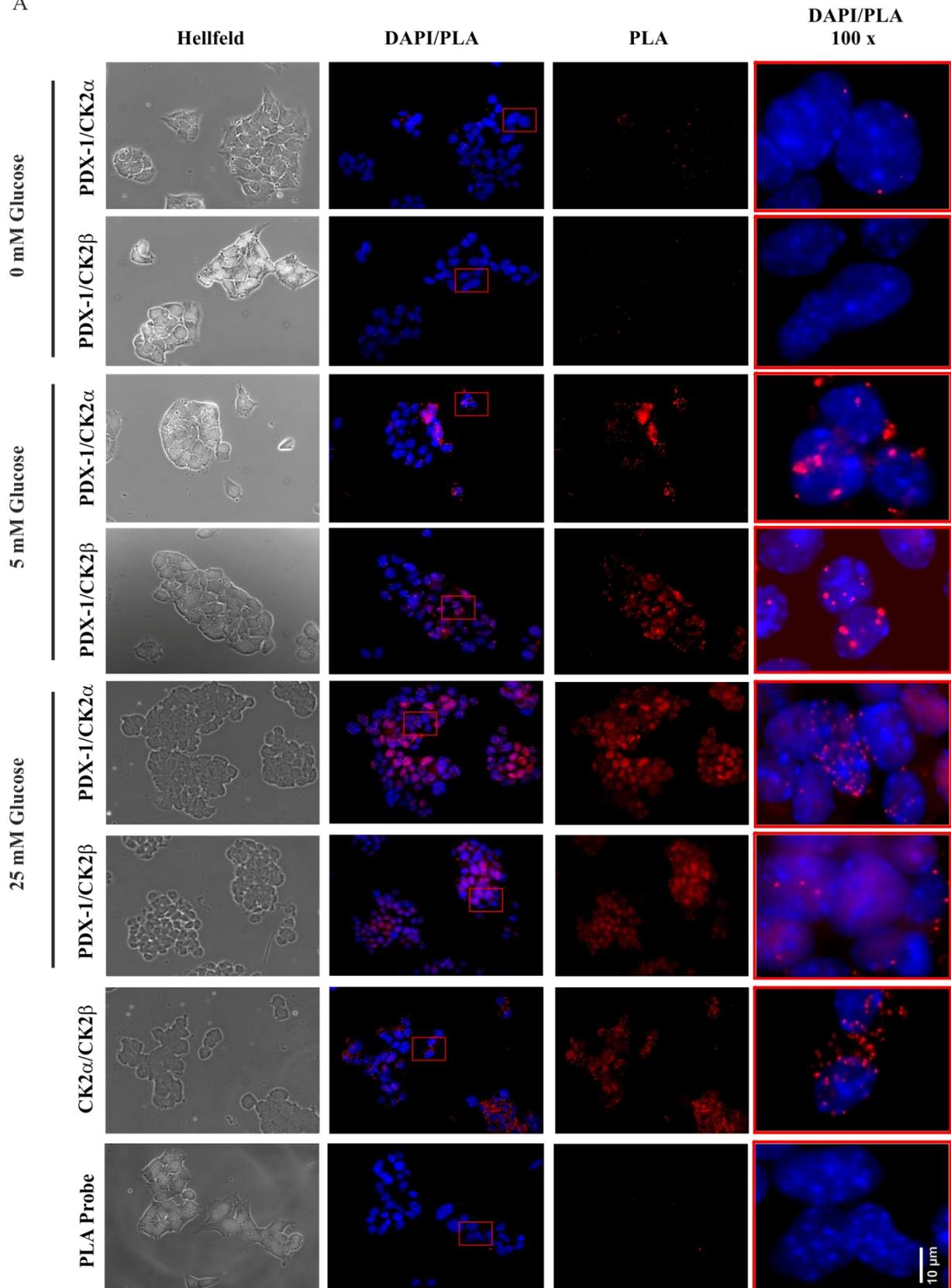
Abbildung 21: Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 β unter dem Einfluss von Glucose in MIN6-Zellen. Vier mg Gesamtproteine aus einem MIN6-Zellextrakt wurde zusammen mit einem Gemisch aus Protein-A- und CL-4B-Sephrose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (C: Zellextrakt mit Protein-A- und CL-4B-Sephrose ohne Präzipitation von PDX-1) sowie dem "Input" (10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes) und einer Zellextrakt-Kontrolle (ZE, 100 μ g) in einem 12.5%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Sichtbarmachung von copräzipitierter CK2 erfolgte für die CK2 α -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5 und für die CK2 β -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 6D5 sowie nachfolgende Inkubation mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper als sekundärem Antikörper und enzymatischem Nachweis mit dem ECL Lumilight System. C: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, ZE: Zellextrakt.

Zur Bestätigung der Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2 mit einem weiteren Testverfahren, wurde in den MIN6-Zellen unter ähnlichen Bedingungen ein PLA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach fünfstündigem Glucoseentzug für weitere 4 Stunden unter 0 mM, 5 mM oder 25 mM Glucose auf Deckgläschen kultiviert. Nach Fixieren der Zellen wurden diese mit dem monoklonalen Maus-Antikörper gegen PDX-1 und dem Kaninchen-Antiserum #26 gegen CK2 α bzw. dem Kaninchen-Antiserum #269 gegen CK2 β inkubiert. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich eine Doppelfärbung mit CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) und CK2 β (Kaninchen-Antiserum #269) verwendet, da diese zusammen in der Zelle vorliegen. Eine Spezifitätskontrolle mit den PLA Proben alleine wurde ebenfalls mitgeführt sowie eine Färbung mit den Einzelantikörpern (nicht gezeigt). In Abbildung 22 A ist das Ergebnis des PLA dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass unter 0 mM Glucose nur wenige Spots für PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 β vorhanden sind. Unter 5 mM

und 25 mM Glucose sind jedoch deutliche Spots sowohl für PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 β , ähnlich denen in der Positivkontrolle von CK2 α und CK2 β zu erfassen, welche für eine Assoziation beider Proteine unter diesen Bedingungen stehen. Um zu analysieren, ob die Anzahl der Interaktionssspots bei 5 mM und 25 mM unterschiedlich ist, wurden die Spots der einzelnen Versuchsansätze zweier unabhängiger Versuche ausgezählt und in Abbildung 22 B in einem Balkendiagramm dargestellt. Es ist klar ersichtlich, dass es eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Spots für PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 β bei 5 mM und 25 mM Glucose im Vergleich zu 0 mM Glucose gibt. Die Anzahl der Spots bei 5 mM und 25 mM Glucose ist sowohl für die Interaktion von PDX-1 mit CK2 α als auch mit CK2 β sehr ähnlich, was darauf hindeutet, dass es unter 5 mM und 25 mM Glucose gleich viele Interaktionen von PDX-1 mit CK2 α als auch mit CK2 β gibt. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem Resultat der Coimmunpräzipitation in Abbildung 21, da es laut dem PLA nicht nur eine Interaktion von PDX-1 mit CK2 α , sondern auch mit CK2 β gibt und diese Interaktion unter 5 mM und 25 mM Glucose gleich stark ist. Bei der Auswertung der Ergebnisse muss darauf Rücksicht genommen werden, dass es sich beim PLA um einen Assay mit deutlich höherer Sensitivität und Spezifität handelt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass PDX-1 mit CK2 α und CK2 β assoziiert in MIN6-Zellen unter Glucosestimulation von 5 mM und 25 mM nach vorangegangenem Glucoseentzug vorliegt.

6. Ergebnisse

A



6. Ergebnisse

B

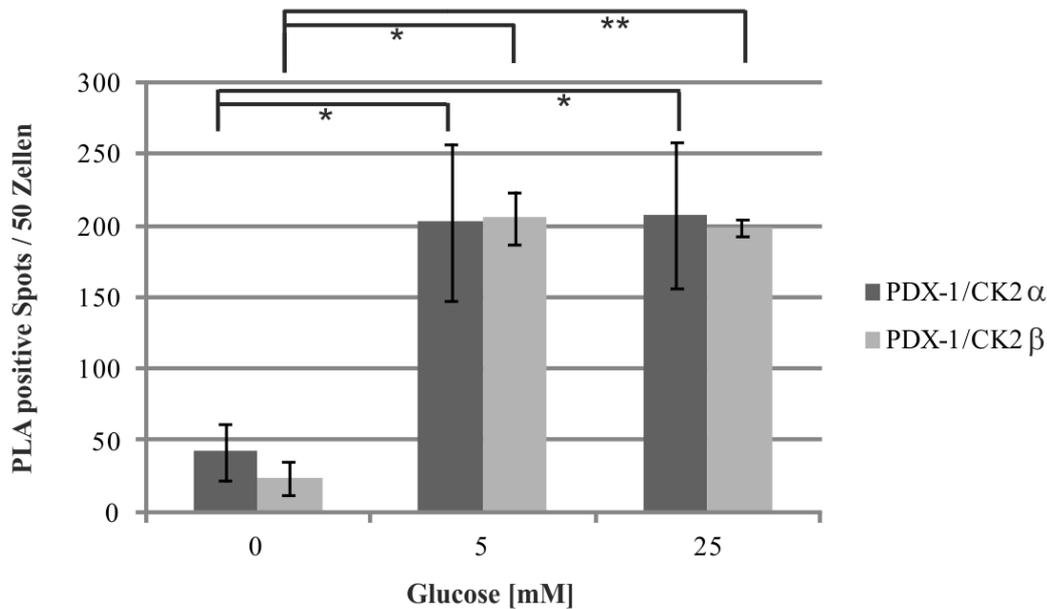


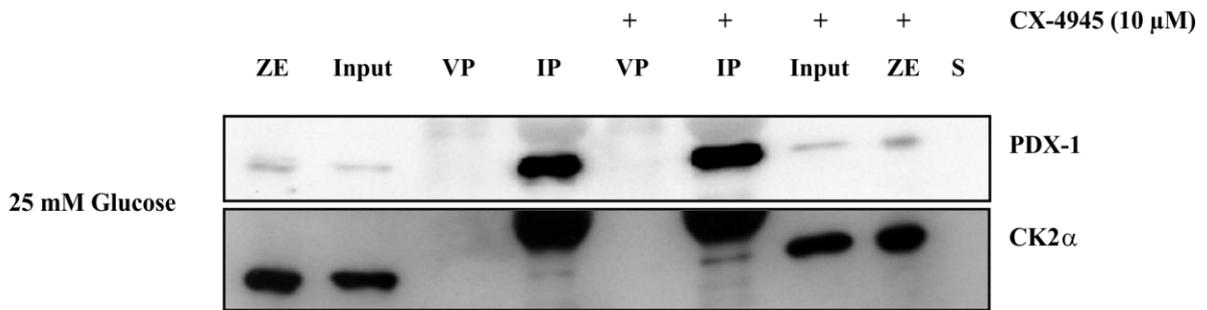
Abbildung 22: Duolink® *In Situ* "Proximity Ligation Assay" (PLA) von PDX-1 und CK2 α bzw. CK2 β in MIN6-Zellen unter Einfluss von Glucose. (A) MIN6-Zellen wurden nach achtstündiger Glucosekarenz für einen Zeitraum von 4 Stunden unter 0 mM, 5 mM bzw. 25 mM Glucose auf Deckgläschen kultiviert. Nach dem Fixieren der Zellen wurden Doppelfärbungen von PDX-1 (monoklonaler Maus-Antikörper) mit CK2 α (Kaninchen-Antiserum #26) bzw. PDX-1 (monoklonaler Maus-Antikörper) mit CK2 β (Kaninchen-Antiserum #269) sowie CK2 α (monoklonaler Maus-Antikörper 1A5) mit CK2 β (Kaninchen-Antiserum #269) als Positivkontrolle im Rahmen eines PLA durchgeführt. Als Spezifitäts-Kontrolle wurde eine Färbung mit den PLA Proben alleine mitgeführt. DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Bilder wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl). (B) Einzelne Spots in jeweils 50 Zellen der Versuchsansätze wurden ausgezählt und graphisch dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Auszählungen aller Versuchsansätze (Auszählung von zweimal 150 Zellen). Die Signifikanz wurde mithilfe des "Student's t-Test" bestimmt wurde, wobei * signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $P < 0.05$ und ** signifikant verschieden von 0 mM Glucose mit $P < 0.01$ ist.

Nachfolgend wurde geprüft, ob die experimentell bestätigte Bindung von PDX-1 und CK2 α unter Hochglucose (25 mM) durch die Zugabe eines CK2-Inhibitors beeinflusst werden kann. Dazu wurden MIN6-Zellen nach fünfstündiger Kultivierung in Medium ohne Glucose einem Glucosestimulus von 25 mM bei gleichzeitiger Gabe von 10 μ M CX-4945 als CK2-Inhibitor bzw. DMSO als Lösemittelkontrolle für weitere 4 Stunden ausgesetzt. Nach der Herstellung von Zellextrakten wurden 2 mg auf eine Mischung mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 gekoppelter Protein-A- und CL-4B-Sepharose gegeben und 2 Stunden inkubiert. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer und anschließender SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese zusammen mit den erforderlichen Kontrollen (Input (10% des im

Experiment verwendeten Zellextraktes), 50 µg Zellextrakt, Präzipitationskontrolle (Zellextrakt mit Protein-A- und CL-4B-Sepharose ohne Präzipitation von PDX-1)) wurde nach Western Blot Analyse präzipitiertes PDX-1 mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone 267712 und copräzipitierte CK2 α mit dem monoklonalen Mausantikörper 1A5 nachgewiesen. In Abbildung 23 A ist zum einen PDX-1 in der IP-Spur der mit DMSO und CX-4945 behandelten Zellen nachweisbar sowie im "Input" und der Zellextrakt-Kontrolle. CK2 α ist ebenfalls im "Input" und der Zellextrakt-Kontrolle zu erkennen sowie copräzipitiert mit PDX-1 in den DMSO und CX-4945 behandelten Zellen. Zur Detektion von Mengenunterschieden an copräzipitierter CK2 α in den DMSO- und CX-4945 behandelten Zellen wurden die jeweiligen Banden aus 2 unabhängigen Versuchen densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) analysiert und in einem Balkendiagramm in Abbildung 23 B prozentual dargestellt, wobei die Expression an CK2 α der CX-4945 behandelten Proben auf DMSO normiert wurde. Es ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied der mit PDX-1 copräzipitierten Menge von CK2 α zwischen den DMSO und CX-4945 behandelten Zellen unter Einfluss von Glucose gibt. Somit hat eine Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit CX-4945 keinen Einfluss auf die Bindung von PDX-1 und CK2 α in MIN6-Zellen.

6. Ergebnisse

A



B

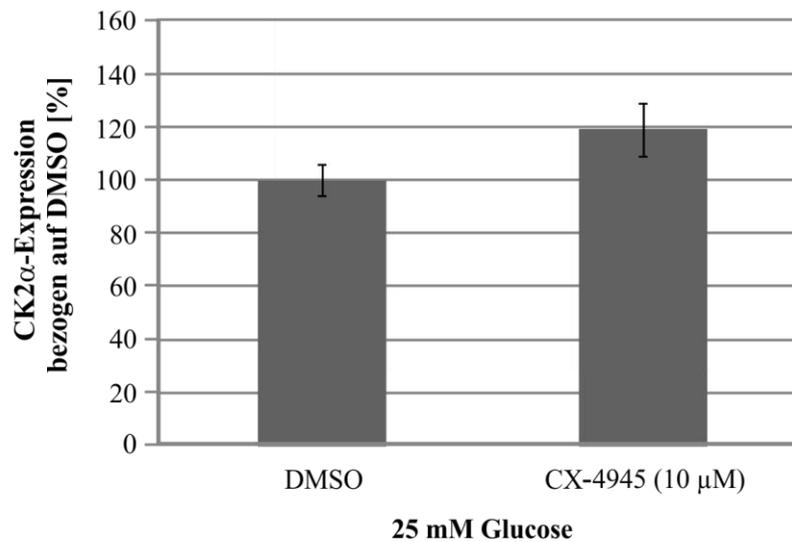
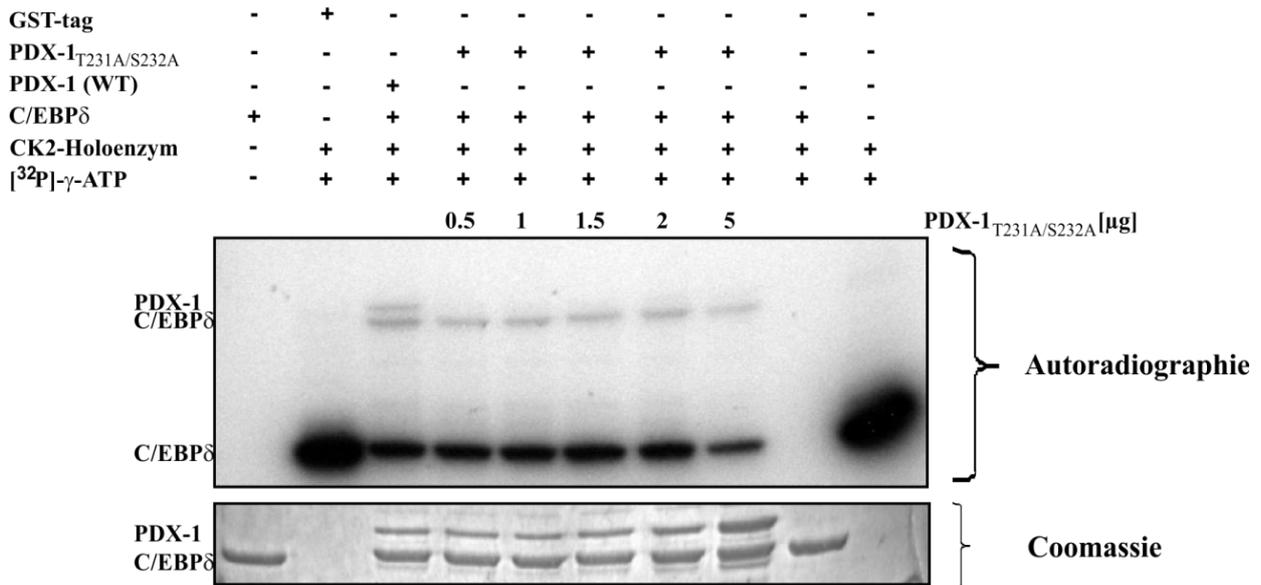


Abbildung 23: Coimmunpräzipitation von PDX-1 und CK2 α unter Einfluss von Hochglucose in MIN6-Zellen nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX-4945. (A) Zwei mg Gesamtprotein aus einem MIN6-Zellextrakt, nach achtstündigem Glucoseentzug 4 Stunden behandelt mit 25 mM Glucose sowie 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle, wurde zusammen mit einem Gemisch aus Protein-A- und CL-4B-Sephrose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Präzipitationskontrolle (VP: Zellextrakt mit Protein-A- und CL-4B-Sephrose ohne Präzipitation von PDX-1) sowie dem "Input" (10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes) und einer Zellextrakt-Kontrolle (ZE, 50 μ g) auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Der Nachweis von präzipitiertem PDX-1 erfolgte mit dem monoklonalen Maus-Antikörper clone 267712 sowie für die copräzipitierte CK2 α -Untereinheit mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 1A5. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit einem enzymgekoppelten Ziege-anti-Maus-, bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper mit dem ECL Lumilight System. VP: Präzipitationskontrolle, IP: Immunpräzipitat, ZE: Zellextrakt. (B) Zur Quantifizierung der Bandenstärke für die copräzipitierte CK2 α mit und ohne CK2-Inhibition wurden die Banden aus 2 unabhängigen Experimenten densitometrisch (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) vermessen und auf die präzipitierte PDX-1-Menge normiert. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen bezogen auf DMSO prozentual dargestellt.

Durch die Bestätigung der Bindung von PDX-1 an CK2 α stellt sich die Frage nach einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Proteine. Dazu wurde zunächst getestet, ob es eine Abhängigkeit der CK2-Aktivität von PDX-1 gibt und falls ja, ob dieser Einfluss auf das CK2-Holoenzym bezogen ist, oder auf die katalytisch aktive CK2 α -Untereinheit. Dazu wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. Für die Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym wurde C/EBP δ (pGEX-4T-1-C/EBP δ) verwendet, welches erstmals mittels *in vitro*-Phosphorylierungsstudien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh als Substrat für das CK2-Holoenzym entdeckt wurde. Für die Phosphorylierung von CK2 α wurde das nukleoläre Phosphoprotein Nucleolin (gereinigtes humanes Nucleolin p100 [192]) als Substrat ausgewählt. Um den PDX-1-Einfluss auf die Phosphorylierung der Substrate zu testen, wurde die Phosphorylierung unter Anwesenheit eines PDX-1-Wildtyp-Konstruktes (pGEX-4T-1-PDX-1-Wildtyp) im Vergleich zu steigenden Mengen an nicht durch die CK2 phosphorylierbarer PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante durchgeführt (pGEX-4T-1-PDX-1_{T231A/S232A}; PDX-1_{T231A/S232A}-Menge bei Phosphorylierung von C/EBP δ durch CK2-Holoenzym: 0.5 μ g-5 μ g; PDX-1_{T231A/S232A}-Menge bei Phosphorylierung von Nucleolin durch CK2 α : 1.25 μ g-7.5 μ g). In diesem *in vitro*-Experiment wurde auf die Verwendung der Phosphorylierungsmutanten statt eines CK2-Hemmstoffes zurückgegriffen, um eine höhere Spezifität bezüglich eines CK2-Effektes zu erhalten. Als Kontrollen wurden die jeweiligen "tags" der Substrate sowie die Autophosphorylierung der CK2 und die Substrate in Abwesenheit von PDX-1 mitgeführt. Nach Phosphorylierung der jeweiligen Proben unter Zugabe von [³²P]- γ -ATP (2 μ Ci/Phosphorylierungsansatz) bei 37°C für 30 Minuten wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach erfolgte deren Färbung mit Coomassie-Blau als Kontrolle der eingesetzten rekombinanten Proteine. Mittels Autoradiographie konnte die Phosphorylierung der Substrate durch die CK2 in Abhängigkeit von PDX-1 sichtbar gemacht werden. In Abbildung 24 A ist gezeigt, dass C/EBP δ als Substrat für das CK2-Holoenzym sowohl in Anwesenheit des PDX-1-Wildtyp-Konstruktes als auch mit steigenden Mengen der PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante gleich gut phosphoryliert wird. Abbildung 24 B, welche die Nucleolin-Phosphorylierung durch CK2 α zeigt, weist ein ähnliches Bild auf. Das Substrat wird ebenfalls unabhängig von der Menge an PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante sowie in Anwesenheit des PDX-1-Wildtyp-Konstruktes gleich gut phosphoryliert. Somit kann aus dem Experiment gefolgert werden, dass PDX-1 keinen Einfluss auf die Aktivität der CK2 ausübt.

6. Ergebnisse

A



B

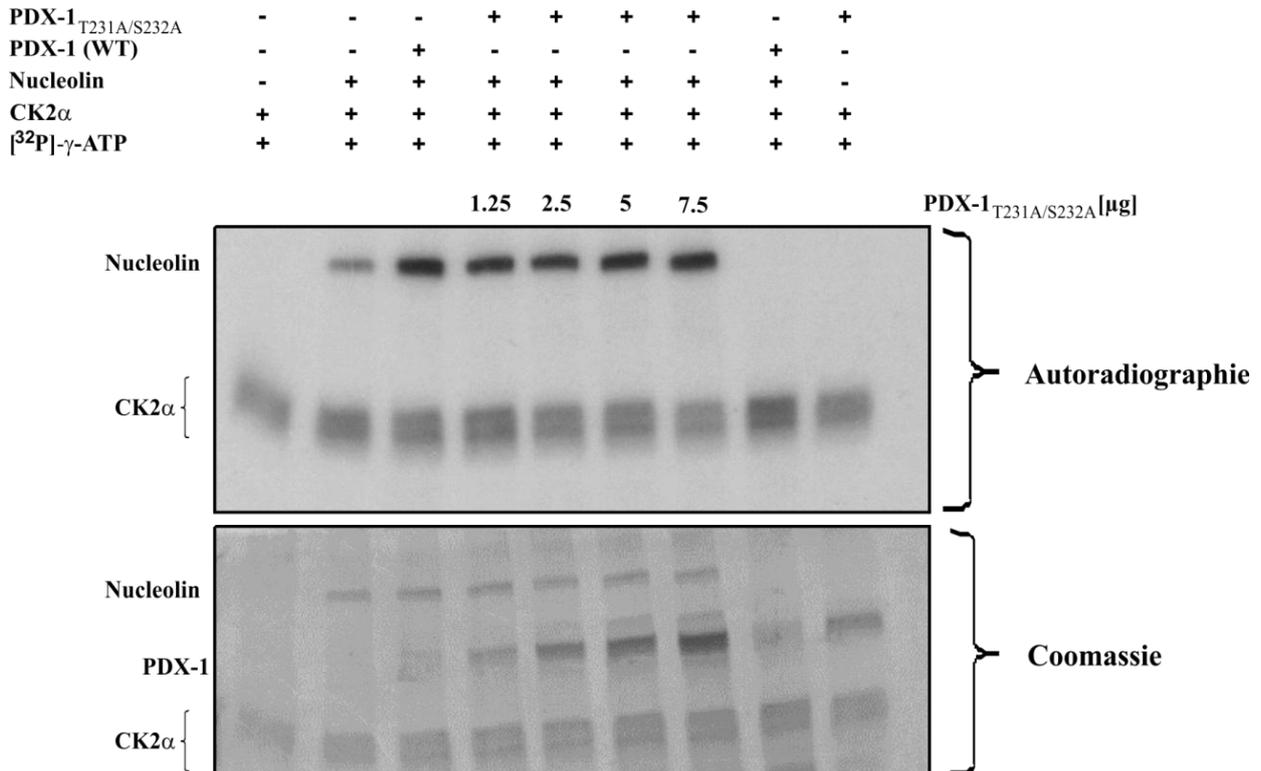


Abbildung 24: Einfluss von PDX-1 auf die Aktivität des CK2-Holoenzym (A) und der CK2 α -Untereinheit (B). *In vitro* wurde eine Phosphorylierung von C/EBP δ durch das CK2-Holoenzym (A) sowie von Nucleolin durch CK2 α (B) unter Anwesenheit eines PDX-1-Wildtyp-Konstruktes sowie steigender Mengen der PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante (PDX-1_{T231A/S232A}-Menge bei Phosphorylierung von C/EBP δ durch das CK2-Holoenzym: 0.5 μ g-5 μ g; PDX-1_{T231A/S232A}-Menge bei Phosphorylierung von Nucleolin durch CK2 α : 1.25 μ g-7.5 μ g) durchgeführt. Dazu wurden die Proben 30 Minuten bei 37°C nach Zugabe von [³²P]- γ -ATP inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel

elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach beendeter Elektrophorese mit Coomassie-Blau zur Detektion der aufgetrennten Proteine gefärbt. Mit dem getrockneten Gel wurde zusätzlich eine Autoradiographie durchgeführt, um die Phosphorylierung der Substrate durch die CK2 in Anwesenheit von PDX-1 sichtbar zu machen. Das Experiment in Abbildung 24 B wurde von Prof. Dr. Claudia Götz aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg durchgeführt.

6.3 Auswirkungen einer PDX-1-Phosphorylierung durch CK2 auf die PDX-1-Zielgene Insulin, Glucokinase und GLUT2

In pankreatischen β -Zellen reguliert PDX-1 nicht nur Glucose-abhängig die Transkription des Insulingens mithilfe von Cofaktoren, sondern auch die Transkription von GLUT2 und Glucokinase [159,219,223]. Nach den bisher erlangten Erkenntnissen betreffend der Interaktion von PDX-1 und CK2 ergibt sich die Frage, ob die PDX-1-Phosphorylierung durch CK2 eine Auswirkung auf die Aktivität des Insulin-, Glucokinase- und GLUT2-Promotors hat. Dazu wurde zunächst untersucht, ob eine Aktivitätssteigerung der verwendeten Promotoren nach Zugabe von Glucose erzielt werden kann, um auf deren Funktionalität in den pankreatischen MIN6-Zellen rückschließen zu können. MIN6-Zellen wurden mit dem entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukt (Insulin: pGEM3ZFM-RIP1-POLYA, Glucokinase: pGL3-GK-1448-Luc, GLUT2: pGL3-rat-GLUT2-Luc) mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und nach 0,5, 2, 4, 6, 8, und 24 Stunden Behandlung geerntet. Mit dem Luciferase-Assay Kit von Promega konnte aus den erhaltenen Zellextrakten die relative Promotoraktivität nach Zugabe der einzelnen Glucosekonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten im Doppelansatz ermittelt werden. Zusätzlich wurden die Zellextrakte der einzelnen Versuchsansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot Analyse wurde für jeden Promotor zu den einzelnen Zeitpunkten die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) ermittelt. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die mittels Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige PDX-1-Expressionsmenge normiert, um die tatsächliche Promotoraktivität unabhängig von der Proteinmenge zu erhalten. Die Werte, die unter 0 mM Glucose erhalten wurden, entsprechen 100% Promotoraktivität. Die unter 5 mM und 25 mM Glucose erzielten Werte wurden zu den einzelnen Zeitpunkten jeweils auf 0 mM Glucose bezogen. In Abbildung 25 ist das Ergebnis des Reporterassays für den Insulinpromotor dargestellt. Demnach gibt es unter 5 mM und 25 mM Glucose eine Aktivitätssteigerung die bereits nach 0,5 Stunden Behandlung zu erkennen ist. Danach nimmt die Aktivität wieder ab. Nach 6

6. Ergebnisse

Stunden kann eine erneute Erhöhung der Aktivität unter 5 mM und 25 mM Glucose beobachtet werden, die ihr Maximum nach achtstündiger Behandlung hat. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Behandlung ist die Aktivität des Promotors im Vergleich zu 8 Stunden wieder abgeflacht.

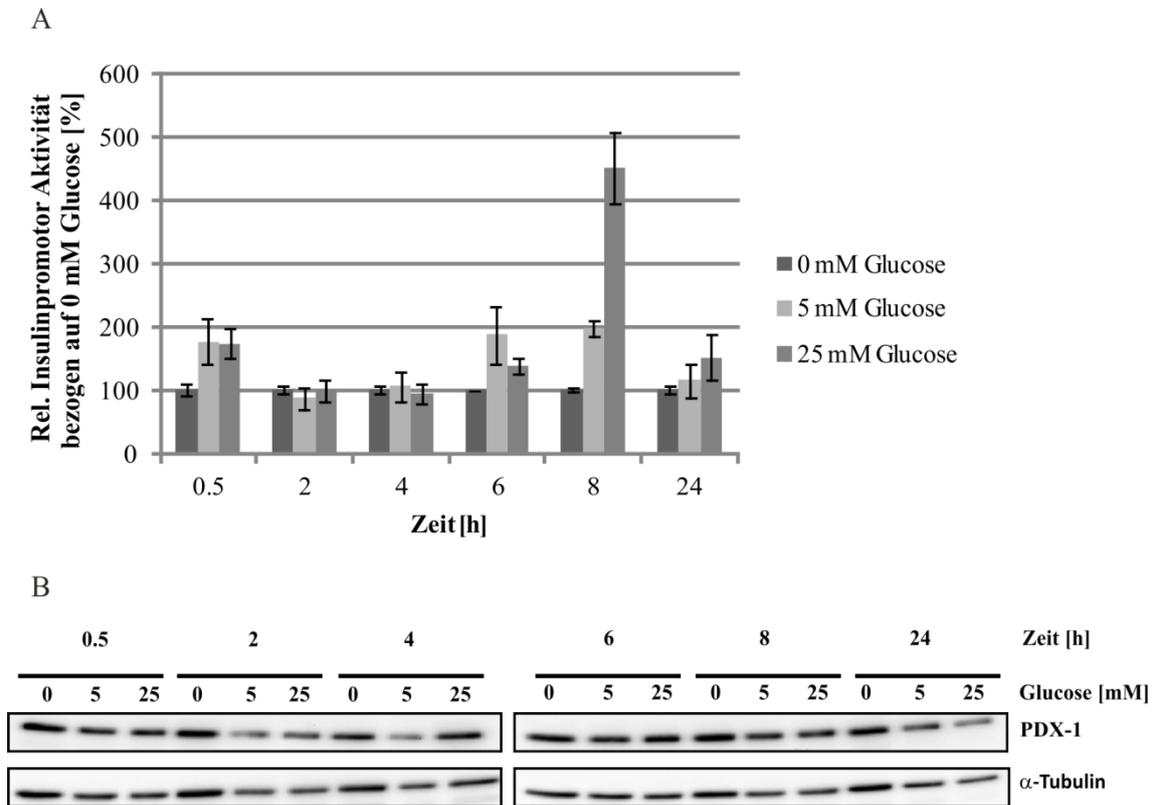


Abbildung 25: Glucoseeffekt auf die relative Insulinpromotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGEM3ZFM-RIP1-POLYA). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Abbildung 26 zeigt das Experiment mit dem Glucokinasepromotor mit einem ähnlichen Ergebnis, wobei die Werte einer höheren Schwankung unterliegen. Der erste leichte Aktivitätsanstieg liegt hier nach 2 Stunden Glucosebehandlung mit 5 mM und 25 mM. Nach 4 Stunden Behandlung unter 5 mM Glucose steigt die relative Aktivität erneut und zeigt ein

6. Ergebnisse

Maximum nach sechsständiger Glucosebehandlung mit 5 mM bzw. 25 mM Glucose. Nach 8 und 24 Stunden ist ebenfalls eine deutliche Steigerung der Aktivität des Glucokinasepromotors unter Einwirkung von Glucose erkennbar, welche im Vergleich zu 6 Stunden Behandlung jedoch reduziert vorliegt.

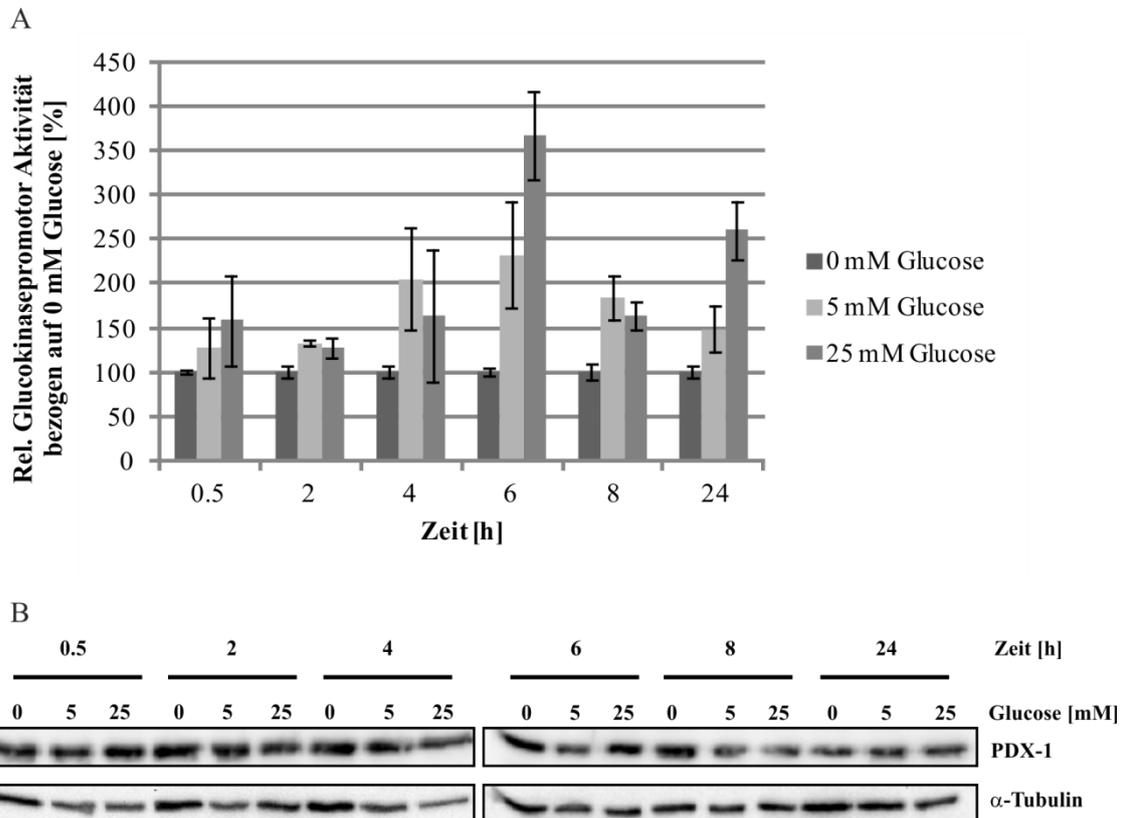


Abbildung 26: Glucoseeffekt auf die relative Glucokinasepromotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Glucokinasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGL3-GK-1448-Luc). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Die Ergebnisse, die mit dem GLUT2-Promotor erhalten wurden, sind in Abbildung 27 dargestellt. Insgesamt wird dieser Promotor bedeutend schwächer durch Glucose angeschaltet

6. Ergebnisse

als der Insulinpromotor und der Glucokinasepromotor. Es ist erkennbar, dass eine Zunahme der relativen GLUT2-Promotoraktivität nach zweistündiger Glucosebehandlung mit 25 mM Glucose vorliegt, die nachfolgend wieder abnimmt. Eine zweite leichte Zunahme kann nach 8 Stunden Behandlung mit 25 mM Glucose im Vergleich zu 0 mM Glucose wahrgenommen werden, welche nach 24 Stunden erneut nachlässt.

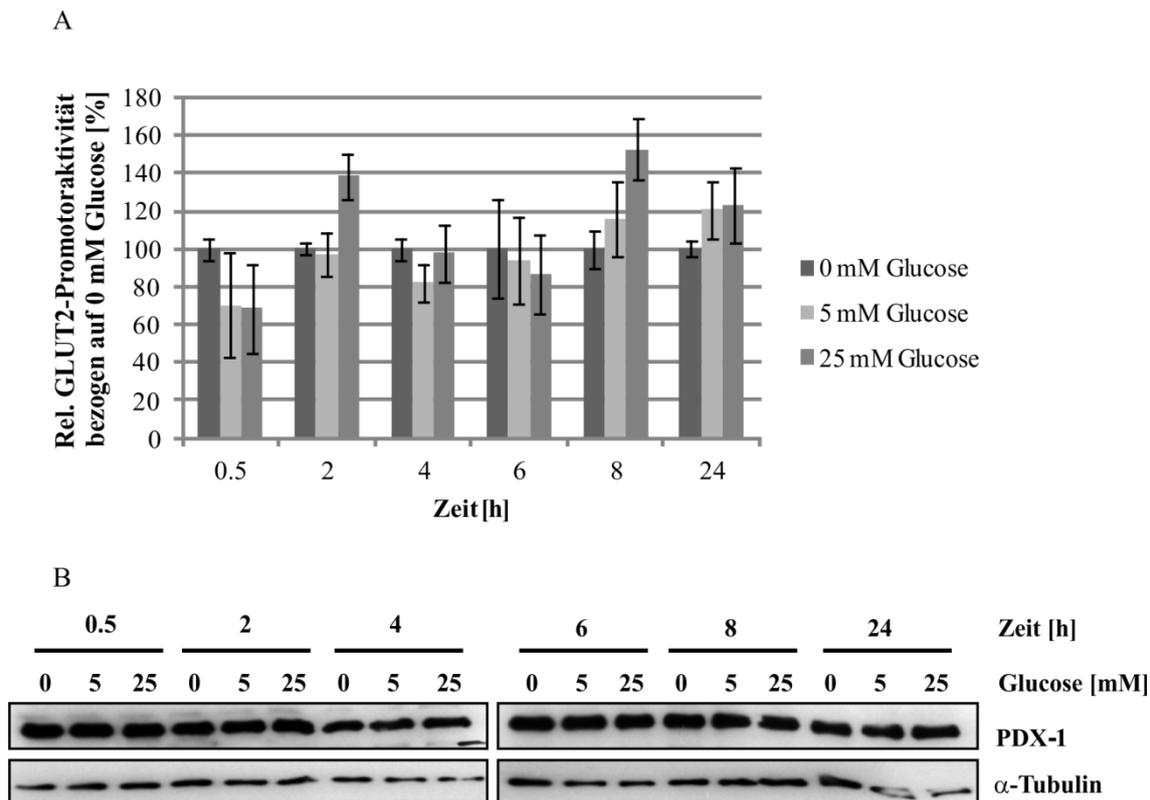


Abbildung 27: Glucoseeffekt auf die relative GLUT2-Promotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem GLUT2-Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGL3-rat-GLUT2-Luc). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Zusammenfassend kann aus diesen ersten Studien bezüglich der Funktionalität der Reporterkonstrukte die Aussage getroffen werden, dass sowohl bei dem Insulinpromotor als

auch bei dem Glucokinasepromotor ein ähnlicher Aktivitätsverlauf nach Glucosestimulation vorliegt, die sich jedoch bezüglich der einzelnen Reporter in der Höhe der Aktivität individuell unterscheidet. Die Aktivität des GLUT2-Promotors fällt im Vergleich zu den beiden anderen Promotoren angesichts der Standardabweichungen deutlich geringer aus.

Nachdem die Funktionalität der einzelnen Reporter nach Glucosestimulation bestätigt werden konnte, wurde untersucht, ob die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 eine Auswirkung auf die Aktivität der durch PDX-1 regulierten Promotoren von Insulin, Glucokinase und GLUT2 hat. Zunächst wurde überprüft, ob eine erhöhte PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 bei gleichzeitiger Glucosestimulation zu einer Aktivitätsänderung der Promotoren führt. Dazu wurden MIN6-Zellen neben den einzelnen Promotorkonstrukten zusätzlich mit FLAG-getagtem CK2 α und CK2 β transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen einer Glucosebehandlung mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose für einen Zeitraum von 0.5 bis 24 bzw. 48 Stunden unterzogen. Mit den zu den jeweiligen Zeitpunkten geernteten Zellen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt zur Beurteilung der relativen Promotoraktivität nach Behandlung. Zusätzlich wurde die Expression von PDX-1 (mittels Kaninchen-Antiserum) sowie von α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) als Ladekontrolle bestimmt. Die Expressionsanalyse dient dazu, die bei dem Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf gleiche Proteinmengen in den Zellen zu normieren. Dargestellt ist das Resultat der Glucosestimulation bei gleichzeitiger CK2-Überexpression bezogen auf 0 mM Glucose. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis des Insulinpromotors nach Glucosestimulation bei gleichzeitiger CK2-Überexpression. Demnach ist 24 Stunden nach Glucosebehandlung mit 5 mM und 25 mM Glucose bei CK2-Überexpression eine erhebliche Aktivitätssteigerung des Insulinpromotors zu verzeichnen. Es gibt auch vorher schon eine leichte Erhöhungen der Aktivität bei 2, 6 und 8 Stunden Behandlung, die jedoch nicht so deutlich ist wie nach 24 Stunden. Achtundvierzig Stunden nach Glucosebehandlung kommt liegt die Promotoraktivität unter 5 mM Glucose als auch unter 25 mM Glucose im Vergleich zu 24 Stunden etwas reduziert vor.

6. Ergebnisse

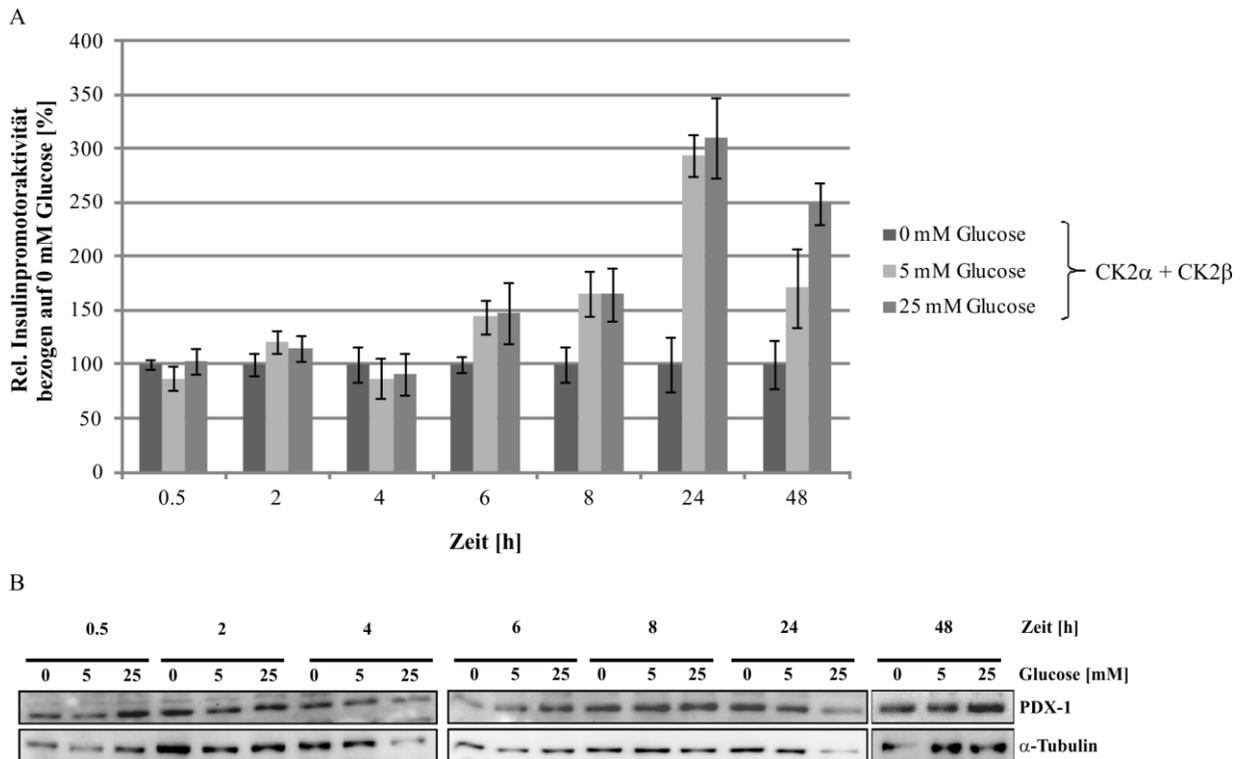


Abbildung 28: Glucoseeffekt auf die relative Insulinpromotor Aktivität in MIN6-Zellen nach CK2-Überexpression. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt (pGEM3ZFM-RIP1-POLYA) sowie FLAG-getaggten CK2 α und CK2 β -Konstrukten mithilfe des Turbofect[®] Transfektionskits transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8, 24 und 48 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Sarah Lupp aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg durchgeführt.

Für den Glucokinasepromotor in Abbildung 29 hingegen ist zwischen 6 und 24 Stunden eine Aktivitätssteigerung der mit Glucose behandelten Zellen bei CK2-Überexpression festzustellen.

6. Ergebnisse

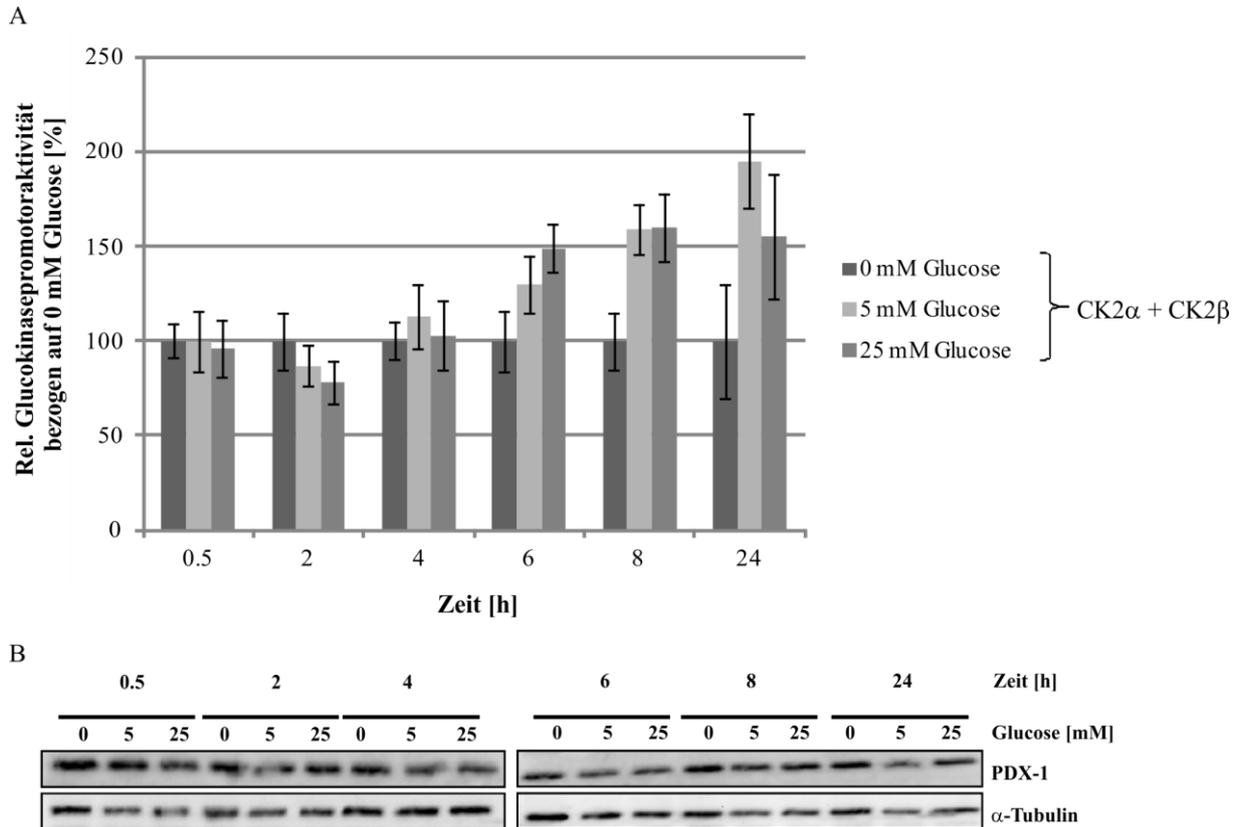


Abbildung 29: Glucoseeffekt auf die relative Glucokinasepromotor Aktivität in MIN6-Zellen nach CK2-Überexpression. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Glucokinasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt (pGL3-GK-1448-Luc) sowie FLAG-getaggten CK2 α und CK2 β -Konstrukten mithilfe des Turbofect[®] Transfektionskits transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0,5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Sarah Lupp aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg durchgeführt.

Die Aktivität des GLUT2-Promotors, in Abbildung 30 dargestellt, scheint eine frühe Steigerung durch Glucosebehandlung und CK2-Überexpression zur Folge zu haben. Nach zweistündiger Behandlung mit 5 mM Glucose bei gleichzeitiger CK2-Überexpression ist eindeutig das Aktivitätsmaximum des Promotors zu beobachten. Zu allen nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten ist die Aktivität des Promotors im Vergleich zu 2 Stunden stark verringert.

6. Ergebnisse

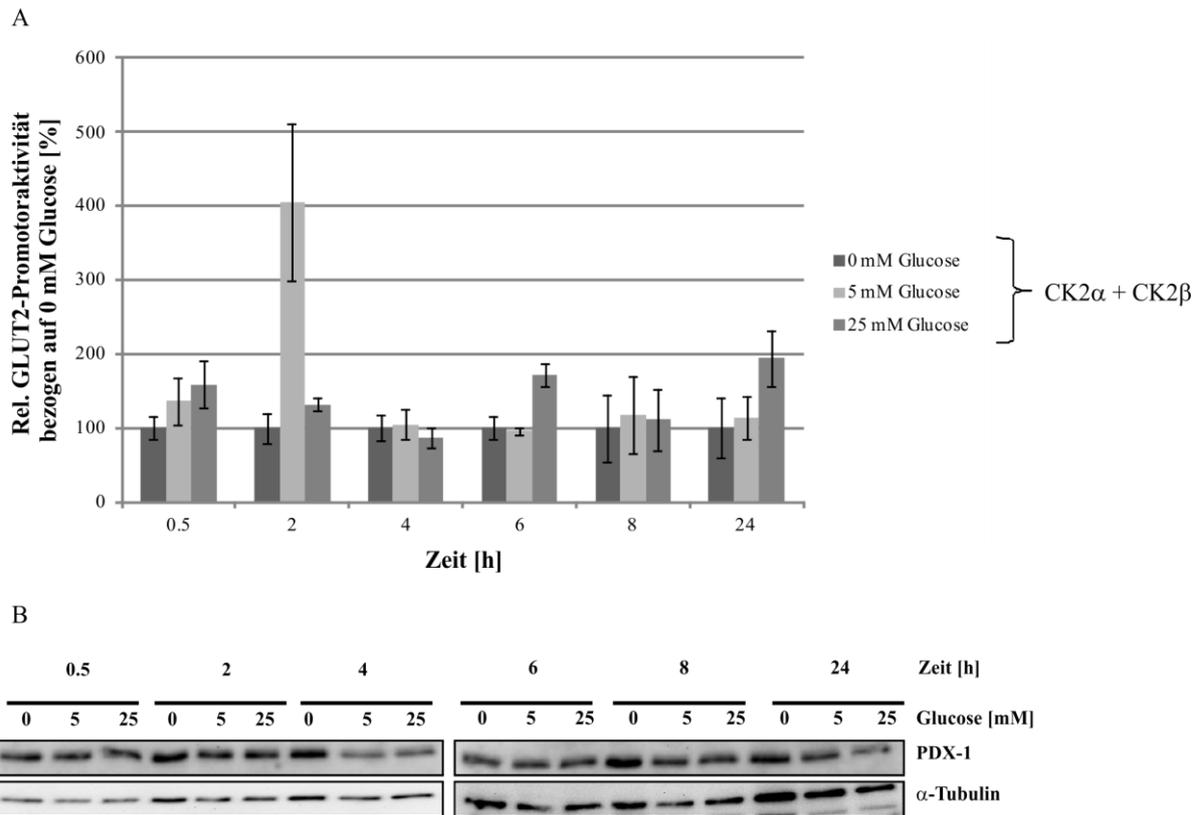


Abbildung 30: Glucoseeffekt auf die relative GLUT2-Promotor Aktivität in MIN6-Zellen nach CK2-Überexpression. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem GLUT2-Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt (pGL3-rat-GLUT2-Luc) sowie FLAG-getaggten CK2 α und CK2 β -Konstrukten mithilfe des Turbofect[®] Transfektionskits transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0 mM, 5 mM und 25 mM Glucose behandelt und die Luciferase-Aktivität wurde nach 0,5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Glucosebehandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit 0 mM Glucose erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die unter 5 mM und 25 mM Glucose erhalten wurden, darauf bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Sarah Lupp aus der Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg durchgeführt.

Durch Überexpression der CK2 besteht die Möglichkeit, dass auch andere Proteine in den β -Zellen des Pankreas phosphoryliert werden und indirekt auf die Aktivität der Promotoren einwirken [5,9]. Um die Spezifität der CK2 zu erhöhen, wurde derselbe Versuchsansatz unter Verwendung eines CK2-Hemmstoffes bei zusätzlicher Glucosestimulation wiederholt. Dazu wurden die mit dem jeweiligen Reporterkonstrukt transfizierten MIN6-Zellen über einen

6. Ergebnisse

Zeitraum von 0.5 bis 24 Stunden mit CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Auch hier wurde für jeden Reporter zu den einzelnen Behandlungszeiten ein Expressionsprofil von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) durchgeführt, damit die im Luciferase-Assay erhaltenen Werte auf die jeweilige Proteinmenge an PDX-1 normiert werden können. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die mit DMSO erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt und diejenigen Werte, welche nach CK2-Inhibition erhalten wurden, jeweils darauf bezogen. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis einer Hemmung der CK2-Kinaseaktivität mit CX-4945 zu den jeweiligen Zeitpunkten für den Insulinpromotor. Es ist deutlich zu erkennen, dass es in der Behandlungszeit von 0.5 bis 24 Stunden eine einzige klare Aktivitätssteigerung des Insulinpromotors nach 6 Stunden gibt.

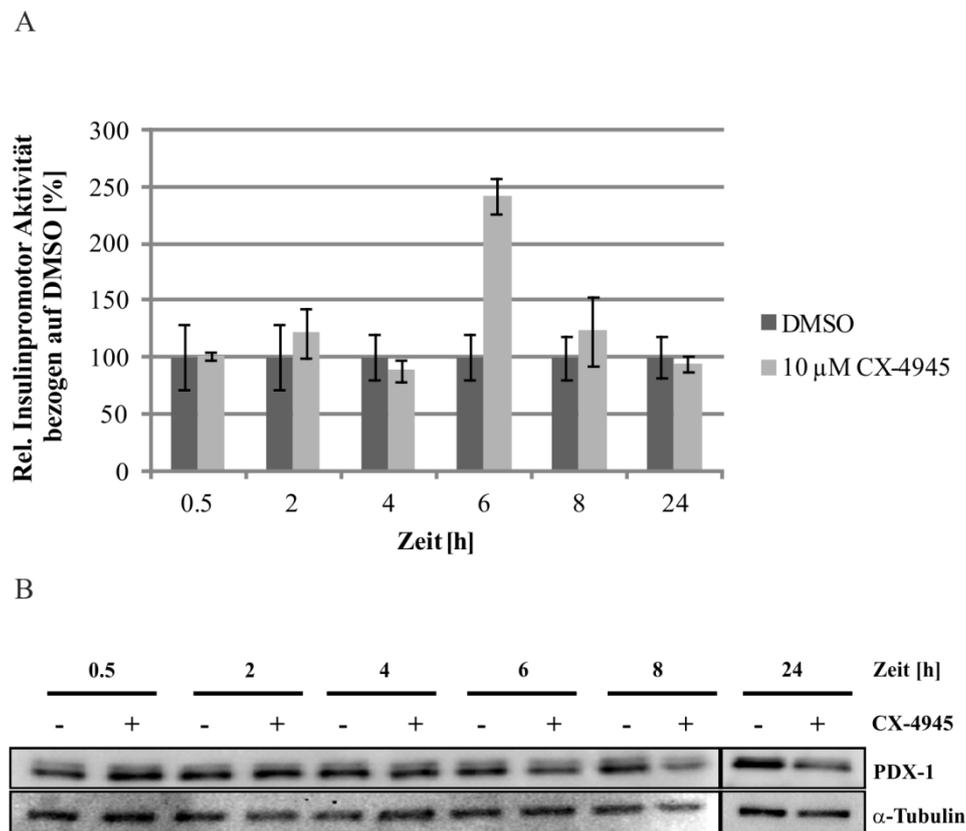


Abbildung 31: Effekt einer CK2-Inhibition mit CX-4945 auf die relative Insulinpromotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Insulinpromotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGEM3ZFM-RIP1-POLYA). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 μ M CX-4945 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Behandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die nach DMSO Behandlung erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die mit CX-4945 Behandlung erhalten wurden, auf DMSO bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen

6. Ergebnisse

prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Die Aktivität des Glucokinasepromotors ändert sich zu keinem der Zeitpunkte zwischen 0.5 und 24 Stunden nach Behandlung mit CX-4945 (Abbildung 32). Nach 8 und 24 Stunden Behandlung scheint die relative Glucokinasepromotoraktivität nach CK2-Inhibition im Vergleich zu DMSO sogar leicht abzunehmen.

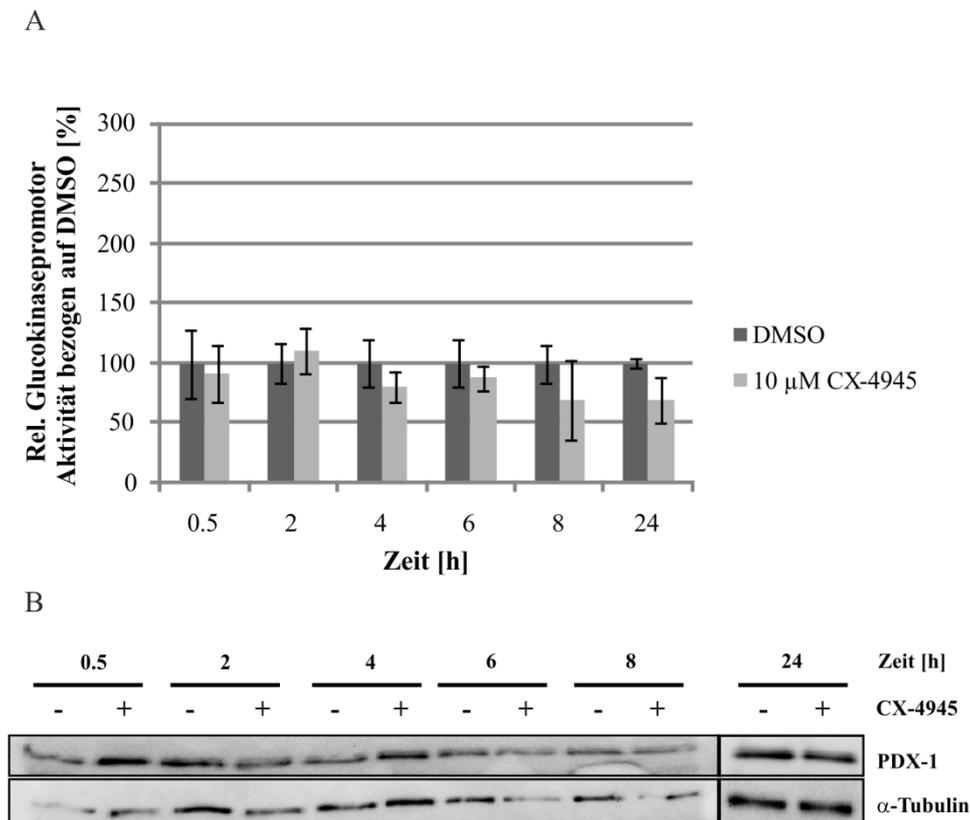


Abbildung 32: Effekt einer CK2-Inhibition mit CX-4945 auf die relative Glucokinasepromotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem Glucokinasepromotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGL3-GK-1448-Luc). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 μ M CX-4945 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Behandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die nach DMSO Behandlung erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die mit CX-4945 Behandlung erhalten wurden, auf DMSO bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels

6. Ergebnisse

densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die Aktivität des GLUT2-Promotors gefunden (Abbildung 33). Zu keinem der Zeitpunkte zwischen 0.5 und 24 Stunden Behandlung mit CX-4945 ist eine signifikante Änderung der Aktivität im Vergleich zu DMSO zu erkennen.

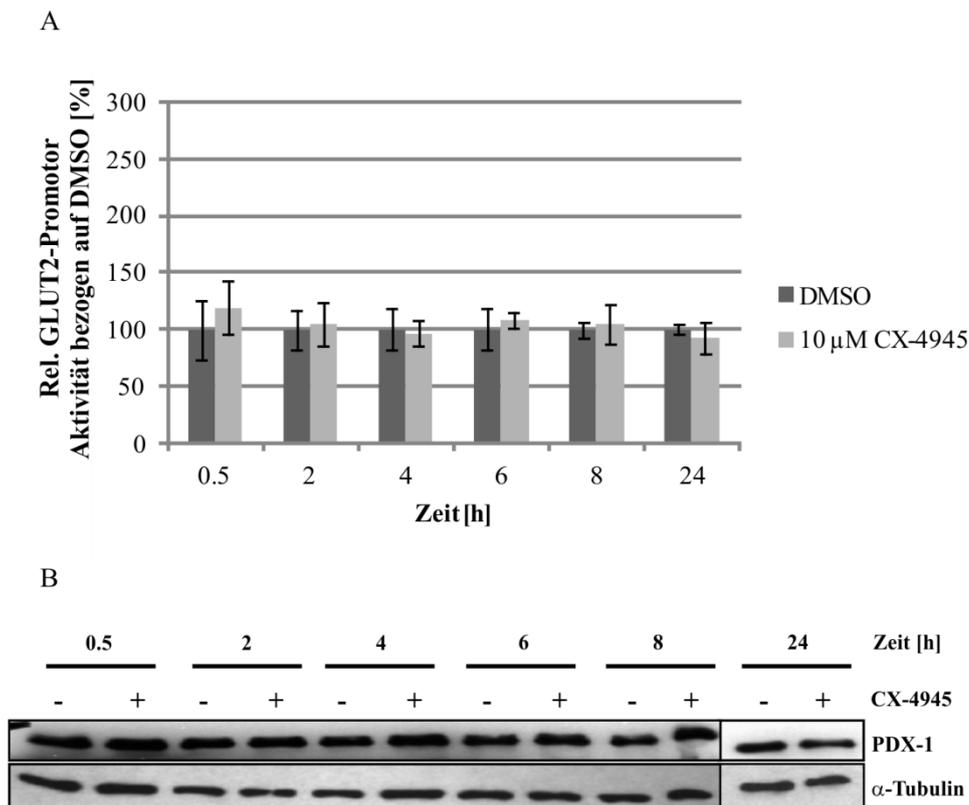


Abbildung 33: Effekt einer CK2-Inhibition mit CX-4945 auf die relative GLUT2-Promotor Aktivität in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden mit einem GLUT2-Promotor Luciferase-Reporterkonstrukt mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert (pGL3-rat-GLUT2-Luc). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 μ M CX-4945 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 0.5, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden Behandlung nach Herstellung von Zellextrakten mit dem Luciferase-Assay Kit gemessen. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die nach DMSO Behandlung erzielten Werte zu den einzelnen Zeitpunkten auf 100% gesetzt, und diejenigen Werte, die mit CX-4945 Behandlung erhalten wurden, auf DMSO bezogen. Das Ergebnis ist als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt. (B) Zusätzlich wurden die Zellextrakte auf die Expression von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) und α -Tubulin (monoklonaler Maus-Antikörper clone DM1A) mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot Analyse untersucht. Die Luciferase-Aktivitäten wurden durch die mittels densitometrischer Analyse der Proteinbanden von PDX-1 und α -Tubulin (BioRad Quantity One[®] 1-D Analysis Software) erhaltenen Daten dividiert, um die Proteinmenge mit einzubeziehen.

Laut Analyse der Promotoraktivitäten von Insulin, Glucokinase und GLUT2 nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität im Zeitraum von 0.5 bis 24 Stunden scheint es lediglich einen

deutlichen CK2-Einfluss auf die Insulinpromotoraktivität zu geben, der in einer Aktivitätssteigerung nach 6 Stunden CX-4945-Behandlung resultiert. Der Glucokinase- und der GLUT2-Promotor bleiben durch die CK2-Inhibition mit CX-4945 unbeeinflusst.

Zusammenfassend kann für diese Versuchsreihe festgehalten werden, dass es je nach Vorliegen der CK2 und deren Aktivität auf PDX-1 unterschiedliche Reaktionen der einzelnen Promotoren betreffend Aktivitätshöhe und -zeitraum in der pankreatischen Zelle gibt. Die Untersuchungen nach CK2-Hemmung zeigen eindeutig, dass der Insulinpromotor als einziger nach Inhibition der CK2 mit CX-4945 eine Aktivitätssteigerung aufweist, was vermuten lässt, dass er durch eine CK2-Hypophosphorylierung von PDX-1 angeschaltet wird. Die übrigen Promotoren bleiben durch die CK2-Hemmung unbeeinflusst.

6.4 Einfluss von Glucose und der CK2 auf die Insulinsekretion

Nachdem es offensichtlich einen Einfluss der PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 auf die Insulingentranskription gibt [139,140], liegt es nahe zu überprüfen, ob die CK2 Auswirkungen auf die Sekretion des Insulins hat. Dazu wurde zunächst freigesetztes Insulin im Zellmedium nachgewiesen. Nach fünfstündiger Glucosekarenz wurden MIN6-Zellen mit 5 mM bzw. 25 mM Glucose stimuliert bei gleichzeitiger Zugabe des CK2-Inhibitors CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden nach Behandlung wurde Kulturmedium entnommen und mittels eines ELISA-Kits exocytiertes Insulin quantifiziert. In Abbildung 34 ist dargestellt, dass die Insulinkonzentration im Medium nach Zugabe von 5 mM bzw. 25 mM Glucose in dem untersuchten Zeitraum stetig ansteigt. Werden die mit CX-4945 behandelten Zellen mit der DMSO-Kontrolle verglichen, so ist sowohl unter 5 mM Glucose als auch unter 25 mM Glucose zu den einzelnen Zeitpunkten jeweils ein geringer Unterschied erkennbar. Dieser Unterschied resultiert bei einigen Zeitpunkten in einer Erhöhung der Insulinkonzentration nach CK2-Inhibition, bei anderen Zeitpunkten ist die Insulinmenge im Medium vermindert. Insgesamt ist eine stetige Zunahme der Insulinmenge nach Glucosezugabe zu erkennen, die Auswirkung einer CK2-Inhibition bleibt fraglich.

6. Ergebnisse

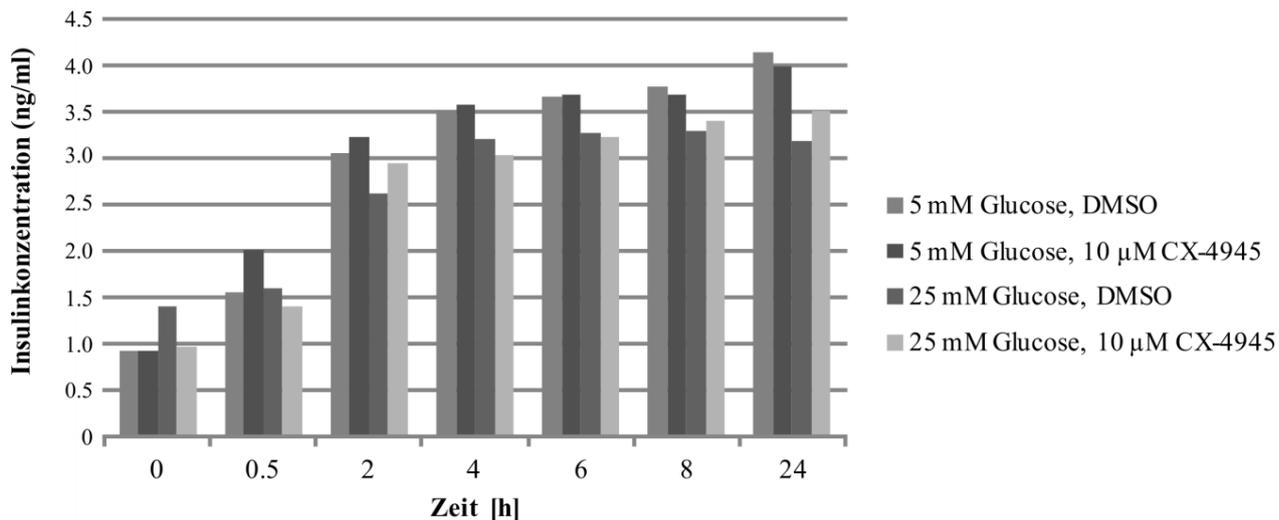


Abbildung 34: Insulinkonzentration im Kulturmedium von MIN6-Zellen nach Glucosestimulation mit 5 mM und 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Hemmung der CK2 mit CX-4945 bzw. DMSO in einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden. MIN6-Zellen wurden zum Glucoseentzug 5 Stunden in Medium ohne Glucose kultiviert, bevor ein Glucosestimulus von 5 mM bzw. 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Zugabe von 10 µM CX-4945 bzw. DMSO zugeführt wurde. In einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden wurde das Kulturmedium der MIN6-Zellen entnommen, aus den mittels eines ELISA-Kits die Insulinkonzentration in ng/ml ermittelt wurde.

Neben einem direkten Einfluss der CK2 auf die Insulinexocytose, welcher in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, wäre es möglich, dass die CK2 eine indirekte Auswirkung auf die Insulinsekretion ausübt. Da die Insulinfreisetzung nach Glucosestimulation von der Calciumkonzentration in der Zelle initiiert wird, besteht die Möglichkeit eines Einflusses über Synaptotagmin1 (Syt1) als weiteres PDX-1-Zielgen. Dabei handelt es sich um ein Calciumsensorprotein, welches bei der Calciumausschüttung aus sekretorischen Vesikeln freigesetzt wird [56]. Zur Beantwortung der Frage, ob es einen Einfluss von Glucose oder CK2 auf die Transkription des Syt1 gibt, wurden MIN6-Zellen zum einen mit 2.5 mM Glucose als Niedrigglucosestimulus und 25 mM Glucose zur Imitation von Hochglucosebedingungen für 24 Stunden behandelt. Zum anderen wurden die Zellen zusätzlich zur Glucosestimulation mit dem CK2-Inhibitor Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle versehen, oder anstatt einer CK2-Inhibition mit einem PDX-1-Wildtyp-Konstrukt (pcDNA3.1/hygro(-)PDX-1-Wildtyp) bzw. der PDX-1-Phosphorylierungsmutante^{T231A/S232A} (pcDNA3.1/hygro(-)PDX-1^{T231A/S232A}) mithilfe des Turbofect[®] Kits transfiziert. Nach der Zellernte wurde mit dem NucleoTrap[®] poly(A) RNA Kit eine RNA-Präparation der Proben durchgeführt. Nach anschließender reverser Transkription in cDNA mit einem Quantiscript[®] Reverse Transcriptase Kit wurde mit spezifischen Primern für Syt1 bzw. Actin als Ladekontrolle die Transkriptionsmenge in den einzelnen Versuchsansätzen mittels

6. Ergebnisse

kompetitiver PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese untersucht. In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass sowohl bei den Zellen, welche nur mit Glucose stimuliert wurden als auch bei denen, welche zusätzlich einer CK2-Inhibition mit Quinalizarin ausgesetzt waren, oder bei den mit den PDX-1-Konstrukten transfizierten Zellen, die Syt1-RNA-Menge im Vergleich zu Actin annähernd gleich ist. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die Transkriptionsmenge von Syt1 weder einem signifikanten Einfluss von Glucose noch einer Beeinflussung durch die CK2 unterliegt.

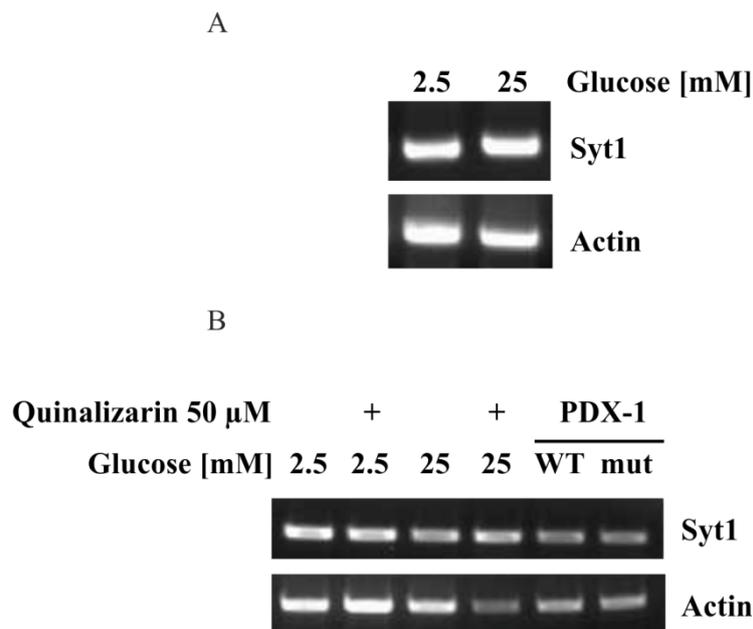


Abbildung 35: Transkriptionsanalyse des PDX-1 Zielgens Synaptotagmin1 unter Einfluss von Glucose und CK2-Inhibition in MIN6-Zellen. (A) MIN6-Zellen wurden für 24 Stunden mit 2.5 mM und 25 mM Glucose behandelt. Nach mRNA-Präparation mit dem NucleoTrap[®] poly(A) RNA Kit und anschließender reversen Transkription in cDNA mit einem Quantiscript[®] Reverse Transcriptase Kit mit spezifischen Primern wird die Transkriptionsmenge sowohl von Syt1 als auch von Actin als Ladekontrolle mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1%-Agarosegel bestimmt. (B) MIN6-Zellen wurden zum einen für 24 Stunden mit 2.5 mM und 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Zugabe des CK2-Inhibitors Quinalizarin (50 μ M) bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt, zum anderen wurden die Zellen mit einem PDX-1-Wildtyp-Konstrukt (pcDNA3.1/hygro(-)PDX-1-Wildtyp) bzw. der PDX-1-Phosphorylierungsmutante_{T231A/S232A} (pcDNA3.1/hygro(-)PDX-1_{T231A/S232A}) mit dem Turbofect[®] Kit transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die mRNA mit dem NucleoTrap[®] poly(A) RNA Kit und anschließender reversen Transkription in cDNA mit einem Quantiscript[®] Reverse Transcriptase Kit mit spezifischen Primern umgeschrieben. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Faizeh AlQuobaili aus der Fachrichtung für Biochemie und Mikrobiologie in der pharmakologischen Fakultät in Damascus durchgeführt.

Zur Untersuchung der Auswirkung von Glucose und einer Hemmung der CK2-Kinaseaktivität auf die Transkriptionsmenge von Syt1 wurde die Syt1-mRNA mittels qRT-

Real time-PCR analysiert. Im Vergleich zur kompetitiven PCR, bei der erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Analyse nach gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte möglich ist, wird in der qRT-*Real Time*-PCR diese Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR, bei der optimale Reaktionsbedingungen herrschen, vorgenommen, was diese Methode aussagekräftiger macht. Zunächst wurde der Einfluss steigender Glucosekonzentrationen auf die mRNA-Menge von Syt1 untersucht. Hierbei wurden MIN6-Zellen mit 0 mM, 2.5 mM, 5 mM und 25 mM Glucose für 24 Stunden behandelt um die Transkriptionsmenge von Syt1 im Vergleich zu GAPDH als Kontrolle zu analysieren. Für die graphische Darstellung wurden die Werte, welche für Syt1 unter den verschiedenen Glucosekonzentrationen erzielt wurden, auf die jeweiligen GAPDH-Werte normiert, um etwaige Pipettierfehler auszugleichen. Zudem wurden alle Werte für Syt1, die unter Glucosestimulation erzielt wurden, auf 0 mM Glucose bezogen. In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass es nach Behandlung der Zellen mit 2.5 mM, 5 mM und 25 mM Glucose nur geringe Unterschiede in der Syt1-mRNA-Menge im Vergleich zu 0 mM Glucose gibt. Aufgrund dieser Befunde muss angenommen werden, dass Glucose keinen Einfluss auf die Transkriptionsmenge des PDX-1-Zielgens Syt1 hat.

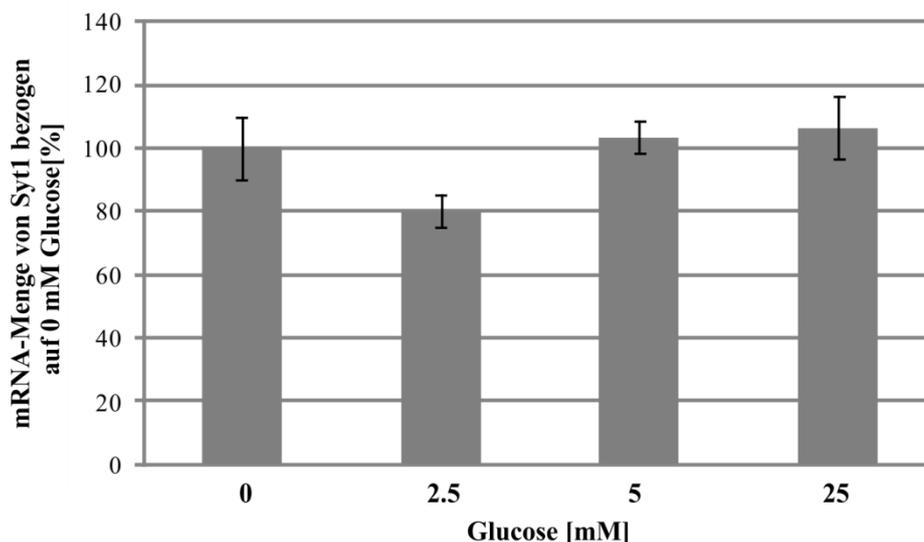


Abbildung 36: qRT-*Real time*-PCR-Analyse von Syt1 unter Einfluss von Glucose. (A) MIN6-Zellen wurden 24 Stunden mit Glucose (0 mM bis 25 mM Glucose) behandelt. Nach RNA-Präparation der Proben wurde der Einfluss von Glucose auf die Transkriptionsmengen von Syt1 und GAPDH als Kontrolle mithilfe einer qRT-*Real time*-PCR mit spezifischen Primern untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt und auf 0 mM Glucose bezogen, wobei die Syt1-Werte der einzelnen Glucosekonzentrationen jeweils auf GAPDH normiert wurden.

6. Ergebnisse

Des Weiteren wurde analysiert, ob es einen Einfluss von CK2 bei gleichzeitiger Hochglucosestimulation auf die mRNA-Menge von Syt1 gibt. Aus diesem Grund wurden MIN6-Zellen mit 0 mM bzw. 25 mM Glucose bei gleichzeitiger CK2-Inhibition mit Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach RNA-Präparation der einzelnen Versuchsansätze wurde erneut die Transkriptionsmenge von Syt1 bzw. GAPDH mit spezifischen Primern in einer *Real-time-quantitativen-PCR* untersucht. Die mit Quinalizarin erhaltenen Werte für Syt1 bei den verschiedenen Glucosekonzentrationen wurden auf DMSO normiert. Abbildung 37 zeigt, dass es bei 0 mM Glucose und 25 mM Glucose in gleichem Maße zu einem geringen Abfall der Syt1-mRNA-Menge nach CK2-Inhibition kommt. Da dieser Unterschied jedoch nicht signifikant verschieden zu den DMSO behandelten Zellen ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine CK2-Inhibition genauso wenig wie eine Glucosestimulation die Transkriptionsmenge des PDX-1-Zielgens Syt1 beeinflusst.

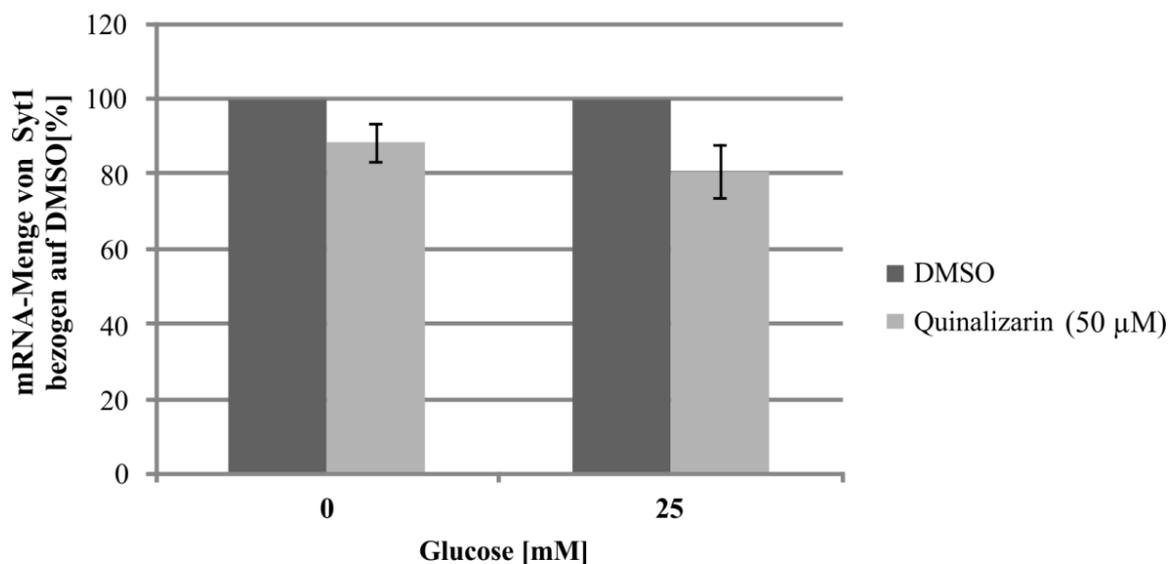
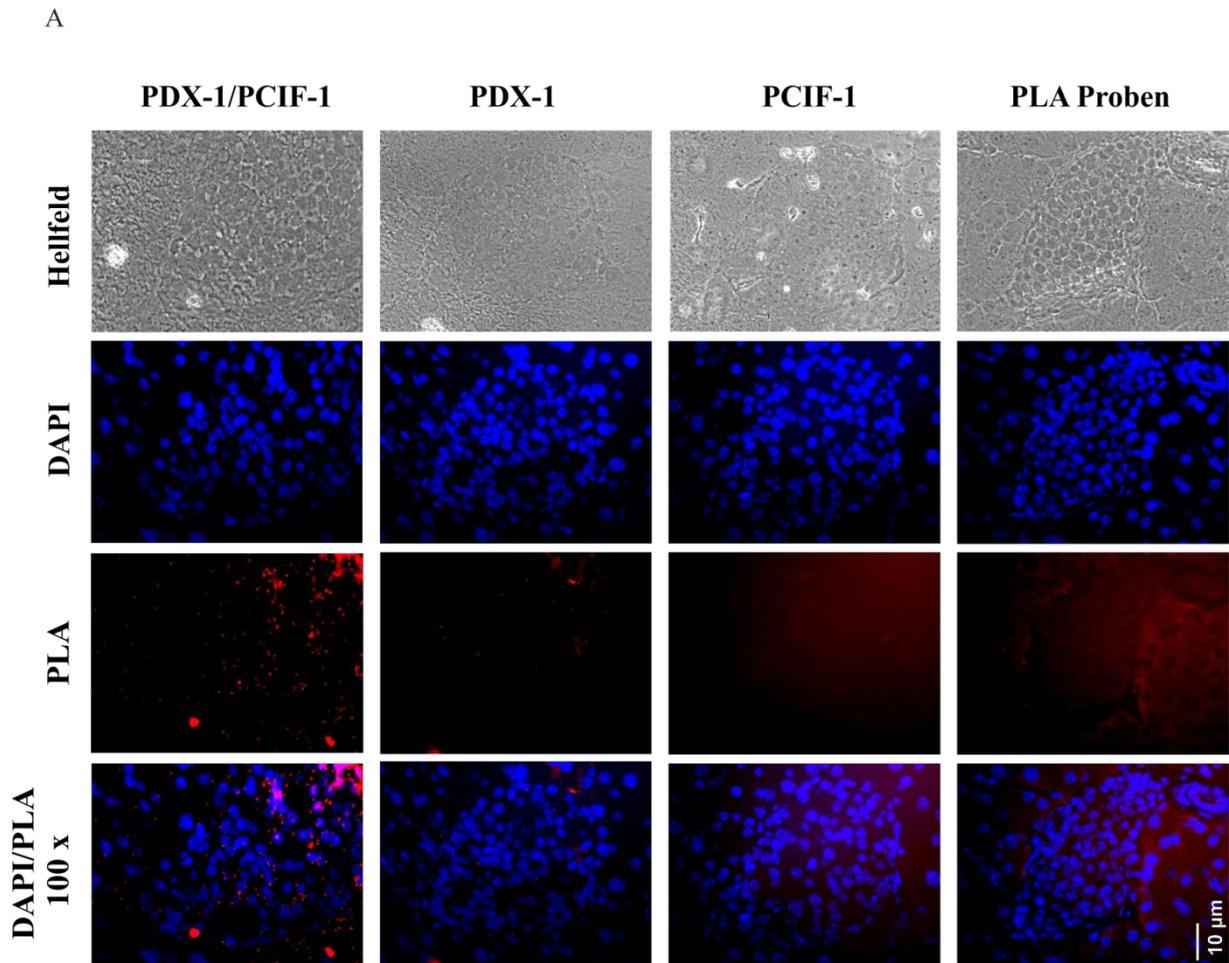


Abbildung 37: qRT-*Real time*-PCR-Analyse von Syt1 unter Einfluss von Glucose bei gleichzeitiger CK2-Inhibition mit Quinalizarin. (A) MIN6-Zellen wurden einer 24 stündigen Behandlung mit 0 mM bzw. 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Zugabe von 50 µM Quinalizarin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle unterzogen. Nach RNA-Präparation der Proben wurde der Einfluss der CK2-Inhibition mit Quinalizarin unter Glucose auf die Transkriptionsmengen von Syt1 und GAPDH als Kontrolle mithilfe einer qRT-*Real time*-PCR mit spezifischen Primern untersucht. Die Ergebnisse der Analyse sind als Balkendiagramm mit den Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Versuchen prozentual dargestellt und auf 0 mM Glucose bezogen, wobei die Syt1-Werte der einzelnen Glucosekonzentrationen jeweils auf GAPDH normiert wurden.

Zusammenfassend kann aufgrund der Experimente ausgeschlossen werden, dass die CK2 einen indirekten Einfluss auf die Insulinsekretion über eine PDX-1-abhängige Syt1-Transkription in pankreatischen Zellen hat.

6.5 Regulation der Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 durch Glucose und CK2

Die Funktion des C-Terminus von PDX-1 ist bislang nur wenig untersucht. Allerdings ist bekannt, dass der "PDX-1 C-terminal Interacting Factor 1", kurz PCIF-1, ein POZ-Domäne-Protein, welches unter anderem in adulten Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas vorkommt, *in vivo* und *in vitro* mit PDX-1 wechselwirkt. Dabei wird eine Hemmung der PDX-1-Transaktivierung und somit auch indirekt die Transkription von Insulin vermindert [111]. Diese Inhibition der PDX-1-abhängigen Transaktivierung von Insulin wird durch Bindung von PCIF-1 an den C-Terminus von PDX-1 (Aminosäuren 210-238) hervorgerufen, wodurch der proteasomale Abbau von PDX-1 gefördert wird [33]. Da sich innerhalb dieser PCIF-1-Bindungsstellen im C-Terminus von PDX-1 auch die beiden PDX-1-Phosphorylierungsstellen für die CK2 befinden (Threonin 231, Serin 232) und weil in der Literatur bislang keine Daten über einen Einfluss der Proteinkinase auf die Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 bekannt sind, liegt es nahe, dies als übergeordnete Fragestellung zu untersuchen. Zumal PCIF-1 hauptsächlich im Pankreas exprimiert wird und eine Interaktion mit PDX-1 gezeigt werden konnte [111], wurde zusätzlich analysiert, ob es einen Einfluss von Glucose auf die Assoziation der Proteine gibt. In der Literatur gibt es nur Daten, die zeigen, dass PCIF-1 in murinen Inselzellen im Zellkern von β -Zellen vorkommt [111], jedoch wurde keine Colokalisation oder Assoziation mit PDX-1 gezeigt. Aus diesem Grund wurde zunächst die biologische Relevanz einer Interaktion von PCIF-1 und PDX-1 in Kryoschnitten muriner Langerhansinseln untersucht. PCIF-1 wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper SPOP B-8 und PDX-1 mit dem Kaninchen-Antiserum gefärbt. Als Kontrollen wurden Einzel-färbungen von PCIF-1, PDX-1 und den PLA Proben mitgeführt. Abbildung 38 A zeigt, dass bei der Doppelfärbung von PCIF-1 und PDX-1 einige deutliche Spots innerhalb der Insel nachweisbar sind, wohingegen die Kontrollen nur wenige positive Signale anzeigen. Dieses Resultat wird nach Auszählen der einzelnen Spots und graphischer Darstellung in Abbildung 38 B dargestellt.



B

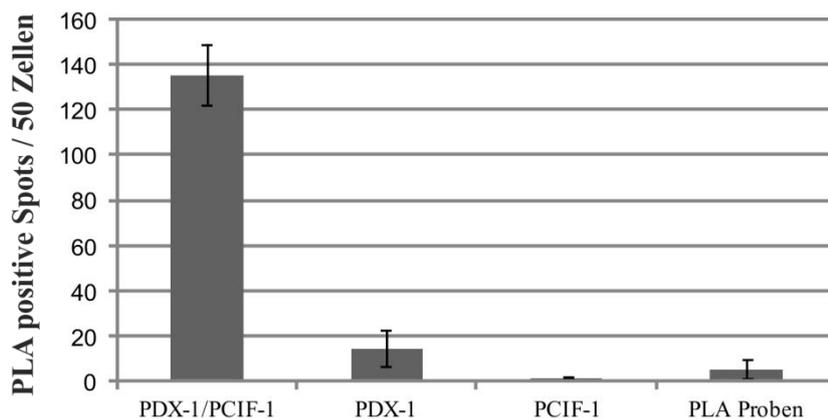


Abbildung 38: Duolink® *In Situ* "Proximity Ligation Assay" (PLA) von PDX-1 und PCIF-1 in Mausinseln.

(A) Kryoschnitte von adultem Mauspankreas wurden einer Doppelfärbung von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) mit PCIF-1 (monoklonaler Maus-Antikörper SPOP B-8) im Rahmen eines PLA unterzogen. Als Spezifitäts-Kontrolle wurde eine Färbung der Einzelantikörper sowie der PLA Proben mitgeführt. DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl). Die Herstellung der Kryoschnitte wurde von Janine Becker aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg

6. Ergebnisse

durchgeführt. (B) Einzelne Spots in jeweils 50 Zellen der Versuchsansätze wurden ausgezählt und graphisch dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte mit den Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Auszählungen aller Versuchsansätze (Auszählung von zweimal 100 Zellen).

Nachdem eine Interaktion von PCIF-1 und PDX-1 an primären Mausinseln gezeigt werden konnte, wurden die Analysen in MIN6-Zellen fortgesetzt, da das Zellkultur-Modell besser dazu dient einen Einfluss von physiologischen Stimuli, wie die Glucosekonzentration oder eine CK2-Inhibition, auf die Assoziation beider Proteine genauer zu untersuchen. Außerdem gibt es in der Literatur nur Colokalisationsstudien von überexprimierten PDX-1- und PCIF-1-Konstrukten in HeLa-Zellen [111]. Deshalb wurde als nächstes das endogene Vorkommen beider Proteine in MIN6-Zellen mithilfe eines Kaninchen-Antiserums gegen PDX-1 und eines polyklonalen Ziege-Antikörpers gegen PCIF-1 (SPOP K-13) mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 39 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl PDX-1 als auch PCIF-1 unter physiologischen Bedingungen in MIN6-Zellen (5 mM Glucose) im Zellkern vorkommen. Die Überlagerung der roten Fluoreszenz für PDX-1 und der gelben Fluoreszenz für PCIF-1 zeigt, dass beide Proteine in der Zelle colokalisiert vorliegen. Diese Colokalisation der beiden Proteine ist bereits ein erstes Indiz für eine Interaktion in der Zelle.

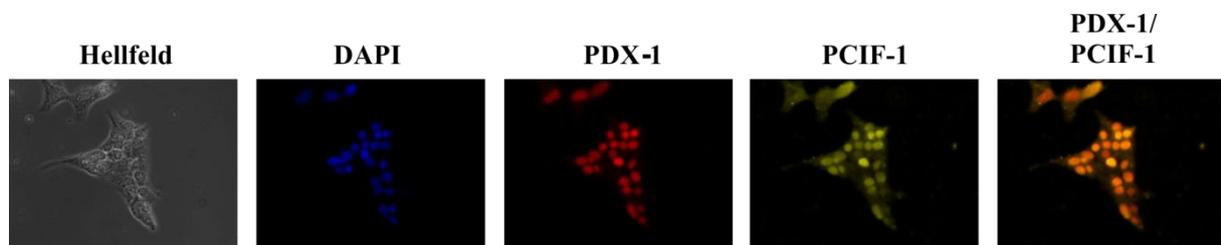


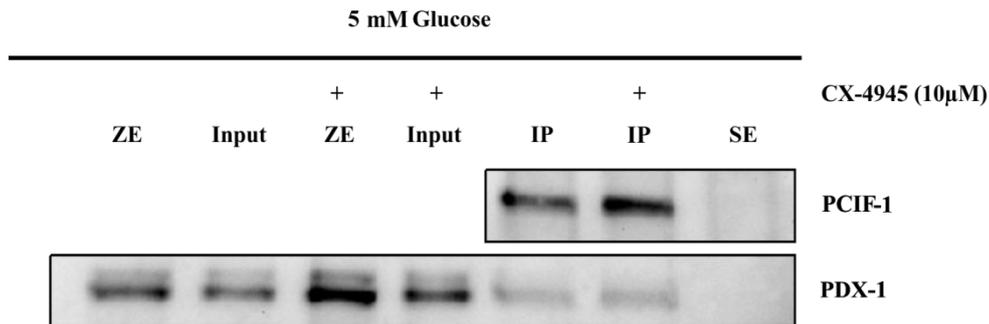
Abbildung 39: Subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und PCIF-1 in MIN6-Zellen. Fixierte MIN6-Zellen auf Deckgläschen wurden mit einem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 sowie einem polyklonalen Ziege-Antikörper (SPOP K-13) gegen PCIF-1 gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-FluorTM594-Antikörper und ein Esel-anti-Ziege-Alexa-FluorTM488-Antikörper verwendet sowie eine DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Die Bilder wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl).

Es ist bekannt, dass CK2 einen negativen Einfluss auf die Insulinentranskription durch Phosphorylierung von PDX-1 hat [139,140]. Es wäre möglich, dass dieser Mechanismus von einer verstärkten PCIF-1/PDX-1-Bindung durch die Phosphorylierung der CK2 im C-Terminus ausgeht, wodurch PDX-1 abgebaut wird und die Insulintranskriptionsrate sinkt. Des Weiteren konnte ein Einfluss von Glucose auf die Aktivität der CK2 nachgewiesen werden. In Coimmunpräzipitationsanalysen wurde getestet, ob die in der Literatur

beschriebene Interaktion von PCIF-1 und PDX-1 [111] von Glucose und der PDX-1-Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 beeinflusst wird. In MIN6-Zellen konnte keine Coimmunpräzipitation von PDX-1 und PCIF-1 nachgewiesen werden, weshalb die Zellen für diese Studie zusätzlich mit PDX-1- und PCIF-1-Konstrukten transfiziert wurden, um die Proteinmenge in der Zelle zu erhöhen. Für die Transfektion mithilfe des Turbofect[®] Kit wurden ein pcDNA3.1 PDX-1-Wildtyp-Konstrukt und ein FLAG-getaggtetes PCIF-1-Wildtyp-Konstrukt verwendet. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen nach fünfstündigem Glucoseentzug einem Glucosestimulus von 5 mM bzw. 25 mM bei gleichzeitiger Gabe von 10 μ M CX-4945 als CK2-Inhibitor bzw. DMSO als Lösemittelkontrolle für 4 Stunden ausgesetzt, um zu erfahren, ob es eine Abhängigkeit der Interaktion der beiden Proteine von der Glucosekonzentration in der Zelle oder von der CK2 gibt. Nach Herstellung der Zellextrakte, wurden je 2 mg auf eine Mischung mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 gekoppelter Protein-A- und CL-4B-Sepharose gegeben und 2 Stunden inkubiert. Nach Elution der Proteinkomplexe mit SDS-Probenpuffer und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zusammen mit den erforderlichen Kontrollen (Input: 10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes, 20 μ g Zellextrakt, Sepharosekontrolle (SE)) wurde nach Western Blot Analyse präzipitiertes PDX-1 mit einem Kaninchen-Antiserum und copräzipitiertes PCIF-1 mit dem monoklonalen Maus-Antikörper Anti-FLAG M2 nachgewiesen. In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Coimmunpräzipitation von PDX-1 und PCIF-1 dargestellt. Zunächst ist PCIF-1 unter 5 mM (A) und 25 mM (B) Glucose eindeutig in der Zellextrakt-Kontrolle sowie im "Input" der Copräzipitation mit und ohne CK2-Inhibition erkennbar, was dafür spricht, dass die Menge an PCIF-1 nach Transfektion ausreichend zur Durchführung einer Coimmunpräzipitation ist. Die Immunpräzipitationsspuren (IP) der beiden Ansätze zeigen sowohl unter 5 mM als auch unter 25 mM Glucose eine schwache, aber dennoch eindeutige Bande für das copräzipitierte PCIF-1 an. Nach Vergleich der IP-Spuren der mit CX-4945 behandelten Zellen zu denen, welche mit DMSO kultiviert wurden, ist auf die Menge an präzipitiertem PDX-1 bezogen, kein Unterschied in der PCIF-1 Copräzipitation erkennbar. Somit kann aus diesem Experiment gefolgert werden, dass es eine Bindung von PDX-1 und PCIF-1 in MIN6-Zellen gibt, diese Bindung jedoch unabhängig von der Glucosekonzentration und von einer PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 ist.

6. Ergebnisse

A



B

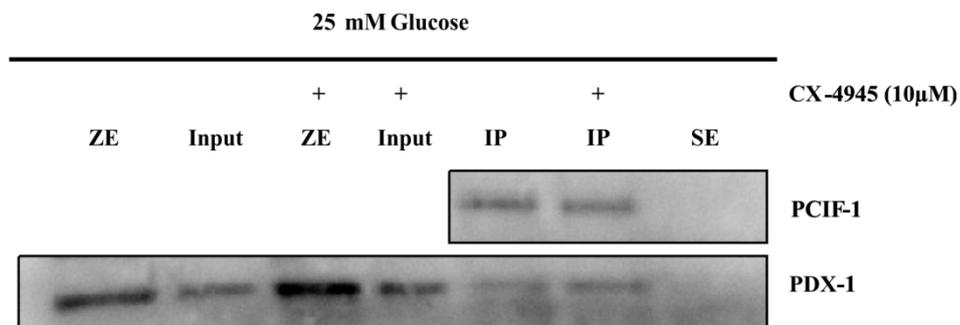


Abbildung 40: Coimmunpräzipitation von PDX-1 und PCIF-1 unter Einfluss von Glucose in MIN6-Zellen nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX-4945. MIN6-Zellen wurden gleichzeitig mit einem pcDNA3.1 PDX-1-Wildtyp- und einem FLAG-getaggen-PCIF-1-Konstrukt transfiziert. Am nächsten Tag wurden 2 mg MIN6-Zellextrakt nach fünfstündigem Glucoseentzug 4 Stunden mit 5 mM (A) bzw. 25 mM (B) Glucose sowie 10 µM CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und zusammen mit einem Gemisch aus Protein-A- und CL-4B-Sepharose, gekoppelt mit Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1, 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die immunpräzipitierten Proteine (IP) mit SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit einer Sepharosekontrolle (SE) sowie dem "Input" (10% des im Experiment verwendeten Zellextraktes) und einer Zellextrakt-Kontrolle (ZE, 20 µg) auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen. Der Nachweis von präzipitiertem PDX-1 erfolgte mit einem Kaninchen-Antiserum sowie für copräzipitiertes PCIF-1 mit dem monoklonalen Maus-Antikörper Anti-FLAG M2. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit einem enzymgekoppelten Ziege-anti-Maus-, bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper mit dem ECL Lumilight System. SE: Sepharosekontrolle, IP: Immunpräzipitat, ZE: Zellextrakt.

Da es mittels Coimmunpräzipitation nicht möglich war, PDX-1 und PCIF-1 unter endogenen Bedingungen zu präzipitieren und das Resultat in Abbildung 40 auf der Verwendung von transfizierten Zellen beruht, welche sich durchaus von den Eigenschaften der endogenen Proteine unterscheiden können, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Assoziation von PDX-1 und PCIF-1 mittels des sehr sensitiven PLA unter endogenen Bedingungen

durchgeführt. MIN6-Zellen wurden hierfür 5 Stunden in Medium ohne Glucose kultiviert, bevor sie einem Stimulus von 5 mM bzw. 25 mM Glucose bei gleichzeitiger Zugabe des CK2-Inhibitors CX-4945 bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle ausgesetzt wurden. Nach vierstündiger Behandlung wurden die Zellen fixiert und mit einem Kaninchen-Antiserum gegen PDX-1 sowie einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen PCIF-1 (SPOP B-8) gefärbt. Als Spezifitäts-Kontrolle wurde eine Färbung der einzelnen Antikörper sowie der PLA Proben alleine mitgeführt (nicht gezeigt). Nach Zugabe der PLA Proben und einer DAPI-Färbung zur Identifikation der Zellkerne, wurde das Ergebnis des PLA mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. In Abbildung 41 A ist ersichtlich, dass unter 5 mM Glucose, sowohl in den mit DMSO als auch in den mit CX-4945 behandelten Zellen deutliche rote Spots zu sehen sind, die für eine klare Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 in MIN6-Zellen sprechen. Nach Quantifikation der Spots ist in Abbildung 41 B dargestellt, dass es nach CK2-Inhibition zu einer geringen Abnahme der Spotanzahl in den Zellen kommt. Unter 25 mM Glucose hingegen ist bereits in der Darstellung des PLA in Abbildung 41 A ersichtlich, dass die Spotanzahl der mit CX-4945 behandelten Zellen deutlich geringer ist, als in den DMSO behandelten Zellen. Nach Quantifizierung der Spots unter 25 mM Glucose, die in Abbildung 41 B zu sehen ist, ist zu erkennen, dass nach CK2-Hemmung nur noch ungefähr die Hälfte der PDX-1/PCIF-1-Interaktionen vorliegen, als nach DMSO-Behandlung.

6. Ergebnisse

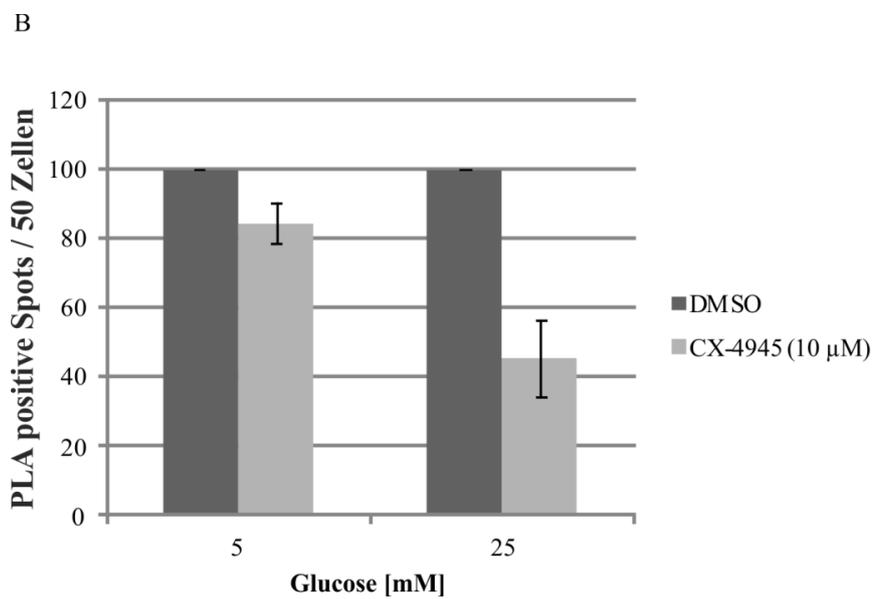
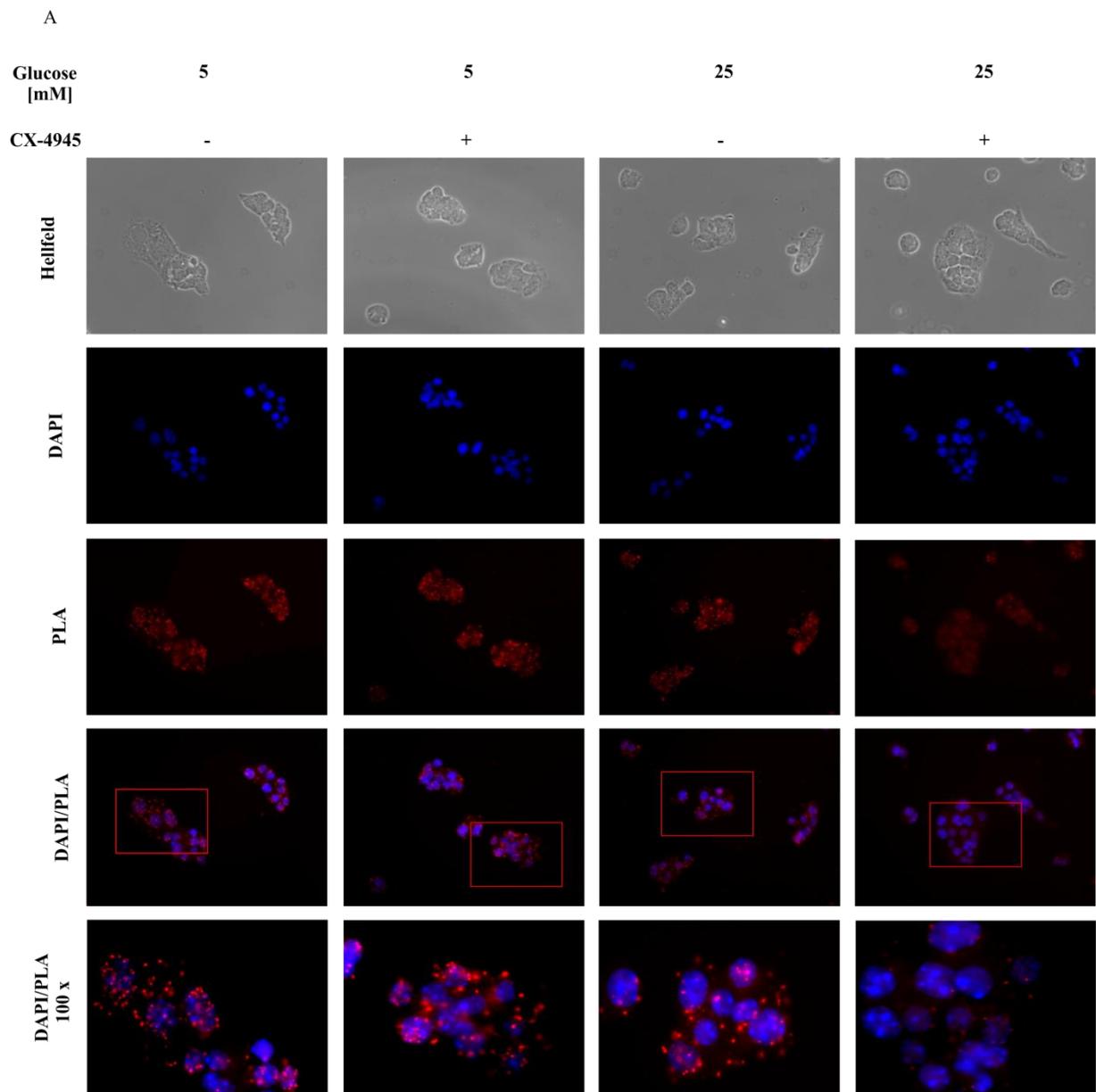


Abbildung 41: Duolink® *In Situ* "Proximity Ligation Assay" (PLA) von PDX-1 und PCIF-1 in MIN6-Zellen unter Einfluss von Glucose und nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX-4945. (A) MIN6-Zellen wurden nach fünfstündiger Glucosekarenz für einen Zeitraum von 4 Stunden in Anwesenheit von 5 mM, bzw. 25 mM Glucose auf Deckgläschen kultiviert. Nach dem Fixieren der Zellen wurden Doppelfärbung von PDX-1 (Kaninchen-Antiserum) mit PCIF-1 (monoklonaler Maus-Antikörper SPOP B-8) im Rahmen eines PLA durchgeführt. Als Spezifitäts-Kontrolle wurde eine Färbung mit den PLA Proben alleine mitgeführt (nicht gezeigt). DAPI wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Die Bilder wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop der Firma Zeiss aufgenommen. Vergrößerung: Okular (10 x), Objektiv (Plan APOCHROMAT 40 x Öl). (B) Einzelne Spots in jeweils 50 Zellen wurden ausgezählt und graphisch dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt die Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Auszählungen aller Spots (Auszählung von zweimal 150 Zellen).

Aufgrund der höheren Spezifität des PLA im Vergleich zur Coimmunpräzipitation und der Tatsache, dass für den PLA PDX-1 und PCIF-1 endogen in der Zelle vorlagen, kann als Ergebnis eine Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 nachgewiesen werden, die sowohl durch Glucose als auch zusätzlich von der Proteinkinase CK2 abhängig ist. Dies lässt vermuten, dass die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 dessen Interaktion mit PCIF-1 im C-Terminus des Proteins fördert, was in einer Verminderung der Transkription des Insulins resultiert.

7. Diskussion

Die Assoziation des pankreatischen Transkriptionsfaktors PDX-1 und der Proteinkinase CK2 konnte bereits durch die Arbeit von Rui Meng [138-140] sowie meiner Diplomarbeit nachgewiesen werden [225,226]. Auf diesen Grundlagen aufbauend wurde in der vorliegenden Dissertation die Interaktion dieser beiden Proteine unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen analysiert. Es besteht die Möglichkeit, dass die Assoziation von PDX-1 und CK2 eine Rolle für die Regulation der subzellulären Lokalisation der beiden Proteine spielt. Über PDX-1 ist in der Literatur bereits beschrieben, dass das Protein in den β - und δ -Zellen des adulten Pankreas exprimiert wird [42,166]. Diese subzelluläre Lokalisation des Proteins konnte in Immunfluoreszenzanalysen an Inselschnitten der Maus bestätigt werden. Über die subzelluläre Lokalisation von CK2 in pankreatischen β -Zellen waren bis zum Beginn dieser Arbeiten keine Daten vorhanden. Die Lokalisationsstudien der CK2 in der Maus wurden auf die Analyse der katalytisch aktiven CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten beschränkt. Mittels Immunfluoreszenz-Färbung von CK2 α in murinen Langerhansinseln im Vergleich zu den Inselzell-Markern Insulin, Somatostatin und Glucagon, konnte eine eindeutige Colokalisation von CK2 α und Insulin detektiert werden, was für ein Vorkommen von CK2 α in den β -Zellen des Pankreas spricht. In den Nuklei der β -Zellen ist PDX-1 mit CK2 α bzw. CK2 α' colokalisiert, wobei die Überlagerung der Fluoreszenzen für PDX-1 und CK2 α deutlich stärker ist, als die mit CK2 α' . Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten von Rui Meng, die eine Bindung von PDX-1 an die beiden katalytisch aktiven Untereinheiten der CK2 zeigen konnte [138]. Dass sowohl PDX-1 als auch CK2 α bzw. CK2 α' in den Kernen der pankreatischer β -Zellen lokalisiert sind, stellt einen Anhaltspunkt für die Interaktion der Proteine im primären System dar. Dieser mittels Immunfluoreszenz erhaltene erste Hinweis wurde durch die Bindung von CK2 α und PDX-1 im Gesamt-Zellysate von murinem Pankreas in Coimmunpräzipitationsanalysen bestätigt. Die Sensitivität der PLA-Analysen ermöglichte es sogar zum ersten Mal eine Assoziation von PDX-1 und CK2 in den β -Zellen der murinen Langerhansinseln zu quantifizieren.

Es ist bekannt, dass die pankreatischen β -Zellen bestrebt sind, auf einen Glucosereiz hin Insulin zu sekretieren um die Glucosehomöostase der Zelle zu erhalten [159]. Weiterhin ist eine Glucose-abhängige Regulation von PDX-1 bewiesen [14,44,54,70,73,102,119,120,151, 171]. Es gibt Autoren die beschreiben, dass PDX-1 unter Niedrigglucosebedingungen eine cytoplasmatische Lokalisation aufweist, welche sich nach Glucosestimulation in den Zellkern verlagert, wodurch PDX-1 als Transkriptionsfaktor Glucose-abhängig Zielgene anschalten

kann [44,119]. Im Gegensatz dazu zeigen andere Literaturdaten, dass Glucose nicht der Urheber der PDX-1-Translokation ist [146]. Die beschriebenen Lokalisationsstudien für PDX-1 beziehen sich hauptsächlich auf humane NesPDX-1-Zellen, die PDX-1 nach stabiler Transfektion überexprimieren [44]. In primären Zellen wurden bislang keine Studien betreffend der subzellulären Lokalisation von PDX-1 angestellt. Somit gibt eine Analyse der subzellulären Lokalisation der beiden Proteine Hinweise auf die physiologische Rolle ihrer Interaktion in Rahmen der Glucose-stimulierten Insulingentranskription. PDX-1 muss nach Glucosestimulation im Nukleus der β -Zelle zu finden sein, um die Transkription von β -Zell spezifischen Zielgenen wie Insulin, GLUT2, Glucokinase oder Somatostatin anzuschalten [106,159,219,223]. Mittels Coimmunpräzipitation PLA wurde die Bindung von PDX-1 und CK2 α bereits bestätigt. Findet ein Bindung von PDX-1 und CK2 auch außerhalb des Kerns der β -Zelle statt, müsste die CK2 in ähnlicher Weise, wie es bereits für PDX-1 von Docherty *et al.* [44] und Macfarlane *et al.* [119] beschrieben wurde, nach Glucoseentzug cytoplasmatisch vorliegen. Ist CK2 α hingegen im Zellkern der β -Zelle zu finden und PDX-1 im Cytoplasma, würde das bedeuten, dass die Komplexbildung von PDX-1 und CK2 sich lediglich auf den Zellkern beschränkt. Experimente zum Glucoseeinflusses auf die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und CK2 im primären Mausmodell zeigten, dass sowohl PDX-1 als auch CK2 α unabhängig von Glucoseentzug oder Glucosestimulation colokalisiert in den Kernen der β -Zellen vorliegen. Da auch PDX-1 in der Maus nach Glucoseentzug nicht im Cytoplasma zu finden war, lässt das Resultat dieses Experiments vermuten, dass es im Mausmodell nicht möglich ist, einen Glucoseeinfluss auf die Interaktion von Proteinen zu analysieren, aufgrund des Bestrebens des Organismus Stoffwechselprodukte je nach Bedarf zu mobilisieren und Stoffwechselwege miteinander zu verknüpfen. Höchstwahrscheinlich wurden im Fall der fastenden Maus Glucosereserven im Organismus mobilisiert und die Gluconeogenese initiiert, um den Blutglucosespiegel konstant zu halten, was eine Erklärung dafür wäre, dass der Blutzuckerspiegel der Mäuse auch nach vierzigstündigem Futterentzug noch bei 75 mg/dl lag. Aus diesem Grund eignete sich das primäre Mausmodell nicht, die in der Literatur kontrovers diskutierte Lokalisation von PDX-1 und die Glucose-abhängige Lokalisation der CK2 zu beantworten. Das Zellkultur-Modell bringt zur Untersuchung der Fragestellung nach einem Einfluss von Glucose auf die Interaktion von PDX-1 und CK2 sowie die Funktion der Wechselwirkung beider Proteine die Vorteile, dass systemische Einflüsse ausgeschaltet werden können, da lediglich organspezifische Faktoren erfasst werden. Des Weiteren ist ein gezielter Einsatz der Versuchsbedingungen möglich und die Experimente können leichter reproduziert werden. Es können geringere Mengen an

Teststimuli oder Hemmstoffen eingesetzt werden und die Anzahl der Versuchstiere wird reduziert. Jedoch hat die Verwendung von Zellkultur-Zellen auch einige Nachteile. Aufgrund der Organspezifität liegt eine unzureichende Erfassung komplexer organübergreifender Wechselwirkungen oder übergeordneter Steuermechanismen auf die Interaktion der Proteine vor und es können nur begrenzt Aufschlüsse über die Art und den Grad des im primären Organismus zu erwarteten Effektes angestellt werden. Aufgrund der Immortalität der verwendeten Zelllinien können Entdifferenzierungsprozesse stattfinden, wodurch zell-spezifische Funktionen verloren gehen können. Die hohe Proliferationsrate der Zellen bietet zudem eine erhöhte spontane Mutationsrate [152].

Als Grundlagenforschung für die Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 in den β -Zellen des Pankreas wurden die folgenden Analysen in MIN6-Zellen durchgeführt, die kleine inselartige Zellverbände bilden und sich sehr ähnlich zu primären β -Zellen verhalten. Zudem reagieren sie auf einen Glucosestimulus mit Insulinfreisetzung [79]. Im Zellkultur-Modell wurde die Analyse der Assoziation von PDX-1 und CK2 für die Regulation der subzellulären Lokalisation fortgesetzt. Nach einem biochemischen Nachweis von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten im Zellextrakt von MIN6-Zellen ergab die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PDX-1 und CK2 unter Normogluucosebedingungen (5 mM Glucose) mittels Immunfluoreszenz, dass PDX-1 ausschließlich im Zellkern der pankreatischen Zellen lokalisiert ist, wohingegen CK2 α und CK2 α' sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma auftreten. Die CK2 β -Untereinheit ist größtenteils im Cytoplasma der Zelle zu finden, nur ein geringer Anteil des Proteins befindet sich nukleär. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass theoretisch eine Bindung von PDX-1 an die katalytischen Untereinheiten der CK2 unter Normogluucosebedingungen möglich wäre. Eine Bindung von PDX-1 und CK2 β ist aufgrund dieses Experimentes eher unwahrscheinlich, da beide Proteine sich in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden. Im Zellkultur-Modell konnte bereits experimentell bewiesen werden, dass PDX-1 unter Niedrigglucose in der nukleären Peripherie lokalisiert ist und dort mit HDACs interagiert. Hochglucose fördert die Interaktion mit p300 und die Lokalisierung im Nukleus der Zelle. Wird die Lokalisation von PDX-1 in der Peripherie durch den Phosphataseinhibitor Okadasäure geblockt, findet keine Interaktion mit HDACs, sondern mit p300 statt [149,151]. Auch BETA2/NeuroD1, ein Protein, das in Kooperation mit PDX-1 an der Insulinentranskription beteiligt ist, ändert seine Lokalisation als Antwort auf den Glucosegehalt der Zelle. Unter Normogluucosebedingungen ist der Transkriptionsfaktor im Cytosol lokalisiert und nach Hochglucosestimulation im Nukleus der Zelle [7,170]. Bei Immunfluoreszenzanalysen konnte festgestellt werden, dass PDX-1 seine

subzelluläre Lokalisation tatsächlich auf einen Glucosestimulus im Zeitraum von 0.5 bis 2 Stunden vom Cytoplasma in den Zellkern verschiebt. Dadurch werden die Literaturdaten bezüglich einer Glucose-abhängigen Translokation des Proteins bestätigt. Diese Translokation von PDX-1 in den Zellkern unter Glucose macht dahingehend Sinn, dass das Protein somit zum Erhalt der Glucosehomöostase des Organismus die Transkription von β -Zell spezifischen Zielgenen übernehmen kann. Die in den primären Mausinseln erhaltene subzelluläre Lokalisation von PDX-1 im Zellkern der β -Zellen ist ebenfalls durch diesen Sachverhalt physiologisch zu erklären. Es gibt auch einige Studien, die über eine Regulation von PDX-1 über die Aktivität von Kinasen nach Glucosestimulation berichten. Überexpressions-Experimente mit der SAPK2 ("Stress-activated Protein Kinase") sowie spezifischen Inhibitoren der Kinase zeigen, dass Glucose den Insulinpromotor über Aktivierung der nukleären PDX-1-Translokation durch den SAPK2-Pathway reguliert [119,122]. Eine weitere Kinase, die an einer Translokation von PDX-1 vom Cytoplasma in den Zellkern unter Glucoseeinfluss beteiligt ist, ist die Per-Arnt-Sim Kinase. Sie phosphoryliert PDX-1 *in vitro* an Threonin 152. Nach Mutationsanalysen an dieser Phosphorylierungsstelle wurde herausgefunden, dass die Phosphorylierung die nukleäre Translokation von PDX-1 als Antwort auf erhöhte Glucosekonzentrationen inhibiert [6]. Meng *et al.* konnten eindeutig beweisen, dass PDX-1 im C-Terminus des Proteins an den Aminosäuren Threonin 231 und Serin 232 von der CK2 phosphoryliert wird [139]. Es gibt auch bereits Literaturdaten, die zeigen, dass die CK2 an der Translokation von Proteinen beteiligt ist. Die nukleäre "Extracellular Signal-Regulated Kinase"-Translokation zur Aktivierung von Zellproliferation oder Differenzierung zum Beispiel wird über die Proteinkinase CK2 vermittelt [177]. Nap1 ("Nucleosome Assembly Protein 1"), ein Cofaktor für den Import von Histon H2A und H2B in *Saccharomyces cerevisiae*, der für den korrekten Ablauf des Zellzyklus wichtig ist, wird ebenfalls durch die CK2 phosphoryliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese CK2-Phosphorylierung von Nap1 den Import von Nap1 in den Zellkern unterstützt [29]. Im Rahmen einer Regulationen von PDX-1 über posttranslationale Modifikationen wäre nach Bestätigung der Assoziation von PDX-1 und CK2 ein Einfluss der CK2 auf die Translokation von PDX-1 unter Glucose denkbar. Über eine Translokation der CK2 selbst gibt es bislang in Eukaryoten nur wenige Informationen. Die CK2 α -Untereinheit besitzt ein klassisches Kernlokalisierungssignal, wohingegen dieses bei der CK2 β -Untereinheit fehlt [128]. Bei Translokationsanalysen der CK2 in NIH 3T3-Zellen mittels "Live-cell Imaging" konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten nach der Synthese vom Cytoplasma in den Kern der Zelle wandern [52,214]. Die Wanderung in den Zellkern ist nicht für alle CK2-Untereinheiten gleich. CK2 β erreicht

den Zellkern etwas langsamer als CK2 α und es konnte nachgewiesen werden, dass die CK2-Untereinheiten dabei aneinander oder an andere zelluläre Moleküle binden [52]. In pankreatischen Inselzellen gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Informationen über eine Translokation der CK2. Immunfluoreszenzanalysen der CK2 in MIN6-Zellen unter Glucoseeinfluss ergaben, dass die CK2-Untereinheiten nach Glucosekarenz ausschließlich im Cytoplasma der β -Zellen nachzuweisen sind. Im Vergleich zu der Immunfluoreszenz der CK2-Untereinheiten unter 5 mM Glucose ohne vorherigen Glucoseentzug, haben die CK2 α - und CK2 α' -Untereinheiten also ihre Lokalisation unter Glucosekarenz ähnlich wie PDX-1 zugunsten des Cytoplasmas verändert. Nach Glucosestimulation konnte beobachtet werden, dass die CK2-Untereinheiten, zeitversetzt zu PDX-1, ihre subzelluläre Lokalisation vollständig in den Zellkern verschieben, wo sie colokalisiert mit PDX-1 vorzufinden sind. Die unabhängige Translokation von PDX-1 und den CK2-Untereinheiten in den Zellkern, sowie die Tatsache, dass die Glucosekonzentration dafür verantwortlich ist, zeigen, dass die Komplexbildung von PDX-1 und CK2 erst im Kern der β -Zelle stattfinden muss. In der Literatur gibt es ein Beispiel, wo N-terminal zum Kernlokalisierungssignal von Prointerleukin-16 Phosphorylierungsstellen von CK2 und der cdc2-Kinase liegen, die zusammen ein duales, durch Phosphorylierung reguliertes CcN-Motiv binden, wodurch die Kernlokalisierung des Proteins gesteuert wird [228]. Ein solcher Regulationsmechanismus kommt für PDX-1 jedoch nicht in Frage, da sich das Kernlokalisierungssignal und die CK2-Phosphorylierungsstellen an unterschiedlichen Stellen des Proteins befinden, was ein Hinweis dafür ist, dass die Phosphorylierung von PDX-1 durch CK2 keinen Einfluss auf die Translokation in den Zellkern hat. Dass die beiden Proteine nach ihrer zeitversetzten Translokation im Nukleus colokalisiert vorliegen lässt vermuten, dass auch die Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 im Zellkern der β -Zelle stattfindet. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Zur Analyse, ob die PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 an der Translokation des Proteins vom Cytoplasma in den Zellkern auf einen Glucosestimulus hin beteiligt ist, wurde der CK2-Hemmstoff TBB eingesetzt. Im Rahmen der Dissertation wurde die Bedeutung der Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 in 2 unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zum einen wurden mit TBB, Quinalizarin und CX-4945 verschiedene CK2-Hemmstoffe verwendet [35,82,129,174,198], da die Spezifität der einzelnen Inhibitoren im Laufe der Zeit immer weiter verbessert wurde. Der inhibitorische Effekt der einzelnen Hemmstoffe ist davon abhängig, wie gut diese als ATP-Kompetitoren arbeiten und in die katalytische Bindungsstelle der CK2 hineinpassen. Die Sensitivität der Hemmstoffe ist zusätzlich abhängig von der CK2

in der Zelle, die neben dem CK2-Holoenzym auch in Form der einzelne Untereinheiten [65,116,176,205,231], sowie katalytisch aktive Oligomerisationen zu Trimeren, Tetrameren oder höher-oligomeren Formen auftritt [115,217]. Ein Inhibitor kann somit nur eine Auswahl von CK2-vermittelten Prozessen in der Zelle hemmen, da jede CK2-Form verschiedene Prozesse in der Zelle regulieren kann [82]. Der Einsatz von Inhibitoren hat den Vorteil, dass sie einfach in der Handhabung sind und sich als wirkungsvoll erweisen (siehe Abbildung 19). Die Aminosäuresequenz des Proteins bleibt durch deren Einsatz unangetastet. Sie bergen jedoch den Nachteil, dass die bisher bekannten Inhibitoren nicht 100% selektiv für eine einzige Kinase sind und somit auch andere Kinasen hemmen [94,163,186]. Zudem weisen die Inhibitoren nach ausführlichen Analysen auch gewisse Nebeneffekte auf, z. B. wurde CX-4945 neuerdings eine Funktion bei der Regulation des Splicings in der Zelle zugeschrieben, die jedoch als unabhängig von der Rolle der CK2-Inhibition beschrieben wurde [94]. Beim Einsatz von Inhibitoren muss zudem berücksichtigt werden, dass deren Wirksamkeit von der "Turn-over"-Rate der Phosphatstelle abhängig ist. Deshalb ist es essentiell, bei Experimenten verschiedene Zeitpunkte nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor zu berücksichtigen, wie es z.B. in dieser Dissertation bei den Luciferase-Assays gemacht wurde, um die möglicherweise auftretenden unterschiedlichen Effekte der CK2-Inhibition mit einzubeziehen. Andererseits besteht die Möglichkeit der Verwendung der PDX-1-Phosphorylierungsmutante_{T231A/S232A}, welche durch Modifikation der CK2-Phosphorylierungsstellen (Threonin an Position 231 und Serin an Stelle 232 wurden durch Alanin ersetzt) nicht mehr von der CK2 phosphoryliert werden kann. Wird dieses Konstrukt in die Zellen eingebracht, ist ebenfalls eine effektive Hemmung der PDX-1-Phosphorylierung möglich. Jedoch kann die Transfektionseffizienz der Mutanten auch ein kritischer Punkt bei der Verwendung darstellen. Besonders bei Experimenten, die eine Analyse von kurzen Stimulationszeitpunkten bei vorangegangenem Glucoseentzug verlangen, gestaltet sich die Verwendung des Konstruktes sowie dessen Transfektionseffizienz als schwierig. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass durch Verwendung des Konstruktes eine Änderung der räumlichen Struktur des Proteins hervorgerufen wird, was sich auf die Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten auswirken kann. Die Verwendung von siRNA wäre theoretisch eine weitere Möglichkeit die Aktivität der CK2 in der Zelle weitgehend auszuschalten, jedoch würde dabei die potentielle Bindung an PDX-1 direkt sowie auch die Interaktion mit anderen Bindungspartnern der CK2 beeinflusst, wodurch die Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 nicht mehr möglich wäre. Mittels Immunfluoreszenzstudien konnte gezeigt werden, dass nach Hemmung der CK2 mit TBB die

Translokation von PDX-1 unter Glucoseeinfluss in den Zellkern nicht beeinträchtigt wird. Auch unter Verwendung der PDX-1-Phosphorylierungsmutante_{T231A/S232A} war PDX-1 im Zellkern der β -Zelle lokalisiert. Schlussfolgernd konnte durch die beschriebenen Experimente eindeutig bestätigt werden, dass die Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 nicht dazu dient, die subzelluläre Lokalisation der Proteine zu regulieren.

Zu dem bislang diskutierten Glucoseeinfluss gibt es in der Literatur auch Belege über einen "PDX-1-Shuttle" als Antwort auf die Änderung des extrazellulären Insulingehaltes [44]. Es konnte experimentell bewiesen werden, dass die PIK3- und SAPK-Signalwege ("Phosphatidylinositol 3-Kinase"- und "Stress-activated Protein Kinase") dabei involviert sind. Wortmannin, ein PIK3-Inhibitor, hemmt die Glucose- oder Insulin-stimulierte nukleäre Lokalisation von PDX-1 [182]. Zudem stimuliert Insulin auch die DNA-Bindung von PDX-1 in humanen Inselzellen [229] sowie die PDX-1-Proteinexpression [84]. Ein Zusammenhang der CK2 mit Hormonen, wie zum Beispiel Androgenen ist ebenfalls literarisch belegt [61]. Es gibt Arbeiten, die einen Zusammenhang von CK2 und Insulin in der Zelle zeigen konnten: Beispielsweise ist eine Erhöhung der CK2-Aktivität durch Insulin in 3T3-L1 Maus Adipozyten publiziert [202]. In Ratten H4-IIe Hepatoma Zellen zeigte sich eine Aktivitätssteigerung der CK2-Aktivität in einer Spanne zwischen 30% und 150% durch Stimulation mit Insulin [202]. In BALB/c 3T3 Fibroblasten konnte die Aktivität der Kinase über Insulin und den Insulin-like growth factor I erhöht werden [97]. Zudem aktiviert Insulin die CK2 um 50% in Ratten-Fettzellen der Nebenhoden [39]. Meng *et al.* haben bereits ein Modell publiziert, in dem die CK2-Phosphorylierung eine negative Rückkopplungshemmung der PDX-1-abhängigen Insulinsekretion in Pankreaszellen zur Folge hat [140]. Auch in der Literatur gibt es Autoren, die der Meinung sind, dass Insulin einen negativen Effekt auf die Insulinsekretion hat [12,185], andere publizierten einen positiven Effekt [168,234] und auch die Ansicht, dass Insulin gar keinen Effekt auf die Insulinsekretion hat [235]. Um den Unterschied zu analysieren, ob die Translokation von PDX-1 und vor allem der CK2 ein Effekt von Glucose- oder Insulinstimulation ist, wurde die subzellulären Lokalisation von PDX-1 und CK2 in MIN6-Zellen mit einem Insulinstimulus von 100 nM nach Glucosekarenz untersucht. Dabei konnte für die CK2 keine Insulin-abhängige Translokation beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die oben beschriebene Translokation allein Glucose-abhängig ist. Für die Lokalisation von PDX-1 kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass der Translokationseffekt lediglich von Glucose abhängig ist. Zwar ändert sich die Translokation des Proteins innerhalb von 0.5 bis 24 Stunden nach Insulinzugabe nicht, PDX-1 ist jedoch nach 0.5 Stunden Insulinbehandlung vollständig im Zellkern zu finden, wohingegen

nach Glucosestimulation in dem Zeitraum eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation vorlag. Um eine verlässliche Aussage über eine Insulin-abhängige Translokation von PDX-1 zu geben, müsste in einem weiteren Experiment die Lokalisation von PDX-1 nach der Glucosekarenz und vor der Insulinzugabe mit berücksichtigt werden. Die in der Literatur berichtete Translokation von CK2 in NIH 3T3-Zellen [52] führt zur Analyse der subzellulären Lokalisation der CK2 hervorgerufen unter Stimulation von Glucose in anderen Zelllinien als den MIN6. Immunfluoreszenzanalysen in den nicht Glucose-sensitiven β -TC3-Zellen zeigten, dass sich die subzelluläre Lokalisation von CK2 α und CK2 β nach einem Hochglucose-stimulus in einem Zeitraum von 0.5 bis 24 Stunden nicht ändert. Für die CK2-Untereinheiten kann also gefolgert werden, dass der beobachtete Effekt der Glucose-abhängigen Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern sich ausschließlich auf Glucose-sensitive pankreatische β -Zellen bezieht. PDX-1 ist in der nicht Glucose-sensitiven Zelllinie im Untersuchungszeitraum rein nukleär lokalisiert. Ähnlich wie bei der Insulinstimulation ist nicht eindeutig auszumachen, ob PDX-1 in β -TC3-Zellen auch in den Zellkern transloziert. Hierfür ist ein weiteres Experiment nötig, bei dem die subzelluläre Lokalisation des Proteins unmittelbar nach der Glucosekarenz analysiert wird.

Im primären Mausmodell konnte kein Glucoseeinfluss auf PDX-1 und CK2 festgestellt werden. Es gibt viele Literaturstellen, die darauf hinweisen, dass zur Ausübung der Funktion von PDX-1, vor allem betreffend der Insulingentranskription und -sekretion, die Glucosekonzentration der β -Zelle des Pankreas essentiell ist [14,44,54,70,73,102,119,120,151,171]. Da über Glucose als physiologischen Regulator der CK2 in der Literatur bis jetzt nichts bekannt ist, wäre es möglich, dass die bereits im Mausmodell nachgewiesene Bindung von PDX-1 und CK2 von der Glucosekonzentration der Zelle abhängt. Eine Analyse der Auswirkung verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Expression von PDX-1 und CK2 in MIN6-Zellen zeigte, dass sich weder für PDX-1 noch für die CK2-Untereinheiten auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge registrieren lässt. Bezüglich der Expression von PDX-1 deckt sich dieses Ergebnis mit der Beobachtung von Andrali *et al.* [8]. Die Regulation von PDX-1 und CK2 erfolgt somit nicht über die Expressionsmengen der Proteine. Weiterhin wäre eine Regulation der Aktivität der CK2 durch Glucose denkbar. Meng *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Aktivität der CK2 durch Stimulation mit Insulin erhöht wird ohne Änderung der Proteinexpression [140]. Nach Durchführung eines für die CK2 spezifischen Aktivitätsassay konnte ein signifikanter Anstieg der CK2-Aktivität mit Zunahme der Glucosekonzentration beobachtet werden, der unter 25 mM Glucose wieder leicht reduziert war. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass Glucose die Aktivität der CK2

erhöht. Eine solche Aktivitätsänderung der CK2 abhängig von der Glucosekonzentration der Zelle ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Die leichte Reduktion der Aktivität unter 25 mM könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine chronische Hyperglykämie eine Verminderung der β -Zell Funktion zur Folge hat, ähnlich wie es unter diabetischen Bedingungen der Fall ist. Dieses Phänomen ist als β -Zell Glucotoxizität bekannt [85,161,196]. Die Hyperglykämie produziert oxidativen Stress in der β -Zelle, was die Insulingenexpression und -sekretion vermindert [16,36,46,76,85,88,132,161,184,196,210]. Neben dem Einfluss von Glucose auf die Aktivität der CK2 wäre auch denkbar, dass die Aktivität der Proteinkinase durch die Bindung an PDX-1 reguliert wird. In der Literatur gibt es Beispiele für Proteine, die an CK2 binden und dadurch die CK2-Aktivität beeinflussen [20,40,201]. Mithilfe eines *in vitro*-Phosphorylierungsassays wurde im Zusammenhang mit den Bindungsanalysen mittels Coimmunpräzipitation und PLA die Aktivität des CK2-Holoenzym als auch der CK2 α -Untereinheit, betreffend der Phosphorylierung spezifischer Substrate, unter Anwesenheit eines PDX-1-Wildtyp-Konstruktes im Vergleich zu steigenden Mengen der PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante überprüft. Diese PDX-1-Mutante eignet sich aus dem Grund zur Analyse eines Einflusses von PDX-1 auf die Aktivität der CK2, da die Phosphorylierungsstellen für die CK2 (Threonin an Stelle 231 und Serin an Position 232) durch nicht phosphorylierbare Alanine ausgetauscht wurden. Außerdem wurde auf die Verwendung der PDX-1-Phosphorylierungsmutante an Stelle eines CK2-Hemmstoffes zurückgegriffen, um zum einen eine höhere Spezifität bezüglich eines CK2-Effektes zu erhalten, in dem die Konkurrenz von phosphorylierungsfähigem zu nicht phosphorylierungsfähigem PDX-1 ausgeschaltet wird. Als Substrat für die Phosphorylierung durch das CK2-Holoenzym wurde C/EBP δ , ein Leucin-Zipper Trans-kriptionsfaktor, der als Inhibitor der Insulingentranskription gilt [195], eingesetzt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Montenarh konnte CEBP/ δ mittels *in vitro*-Phosphorylierungsstudien erstmals als Substrat des CK2-Holoenzym entdeckt werden. Für die Phosphorylierung von CK2 α wurde das nukleoläre Phosphoprotein Nucleolin als Substrat verwendet [192]. In diesem *in vitro*-Experiment wurden für die Phosphorylierung der CK2 bereits bekannte Substrate anstatt des synthetischen CK2-Peptides (RRRDDDSDDD) verwendet, um die Phosphorylierung möglichst realistisch widerzuspiegeln. Nach Analyse des Phosphorylierungsstatus der Substrate konnte festgehalten werden, dass es keinen Unterschied für die Phosphorylierung von C/EBP δ und Nucleolin ausmacht, ob das PDX-1-Wildtyp-Konstrukt, oder steigende Mengen der PDX-1_{T231A/S232A}-Mutante im Ansatz enthalten sind. Ein Einfluss von PDX-1 auf die Aktivität der CK2 kann somit ausgeschlossen werden.

Neben dem Effekt von Glucose auf die Aktivität der CK2, besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass Glucose die Funktion des CK2-Holoenzym, Substrate wie PDX-1 zu phosphorylieren, beeinflusst. In der Literatur liegen Daten vor, die zeigen, dass neben Glucose auch Hormone eine vielfältige Funktion innerhalb der β -Zelle haben [28,119,167,187,207,222]. Bei Analysen der Stöchiometrie der CK2-Untereinheiten konnten über einen Zeitraum von 24 Stunden keine signifikante Veränderung der Expression von CK2 α und CK2 β sowohl unter Glucose- als auch unter Insulinstimulation nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Bildung des CK2-Holoenzym nicht von Glucose oder Insulin beeinflusst wird.

Aus den Immunfluoreszenzdaten nach Glucosestimulation geht hervor, dass PDX-1 und CK2 nach deren Translokation im Zellkern colokalisiert sind. Diese Lokalisation in räumlicher Nähe zueinander lässt bereits vermuten, dass die Proteine nach Glucosestimulation im Komplex vorliegen. Bei der Analyse des Glucoseeinflusses auf die Interaktion von PDX-1 und CK2 mittels Coimmunpräzipitation konnte eine Bindung von PDX-1 und CK2 α unter 25 mM vermerkt werden. Eine Interaktion von PDX-1 und CK2 β war weder unter 5 mM noch unter 25 mM Glucose nachweisbar. Dieses Ergebnis ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die CK2-Untereinheiten auch individuelle Aufgaben in der Zelle einnehmen können [116,176,205,218,231]. Die stärkere Bindung von PDX-1 und CK2 α unter 25 mM Glucose ist ein Resultat, das zu den Daten von Meng *et al.* passen würde, die eine verminderte Insulinentranskription durch die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 publizierten [139,140]. Unter chronischen Hochglucosebedingungen ist die Insulinentranskription vermindert, was in der Literatur in einer Verminderung der PDX-1-Transaktivierungsfähigkeit begründet wird [131,132,161,210,224]. Es könnte jedoch auch sein, dass die hier gezeigte verstärkte Bindung an die CK2 unter Hochglucose diesen Effekt hervorruft, wodurch PDX-1 eventuell verstärkt durch die CK2 phosphoryliert wird, was sich ebenfalls in einer Verminderung der Transkription des Insulins zeigen würde. Diese Vermutung müsste jedoch in der Zukunft noch experimentell mittels Phosphorylierungsstudien von PDX-1 unter Einfluss von Glucose belegt werden. Die Analyse der Assoziation von PDX-1 und CK2 mittels PLA bestätigte die Bindung von PDX-1 und CK2 α unter Hochglucosebedingungen und zusätzlich konnte die Assoziation dieser beiden Proteine unter 5 mM Glucose nachgewiesen werden. Mithilfe des PLA war es außerdem möglich eine Assoziation von PDX-1 mit der β -Untereinheit der CK2 unter 5 mM und 25 mM Glucose zu detektieren, die in ihrer Stärke mit der Bindung von PDX-1 an CK2 α vergleichbar ist. Eine Erklärung dafür, warum diese Bindung in der Coimmunpräzipitation nicht zu detektieren war, könnte die sensitivere Analyseemethode des

PLA sein. Unter 0 mM Glucose war mit dem PLA sowohl für PDX-1 und CK2 α als auch für PDX-1 und CK2 β fast keine Bindung zu erkennen. Die beschriebene Bindung von PDX-1 und CK2 α wird auch durch Hemmung der CK2-Kinaseaktivität nicht beeinflusst.

In der Literatur sind Kinasen beschrieben, die indirekt einen Einfluss auf die Transkription von PDX-1 haben: Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Phosphorylierung von PDX-1 über verschiedene Kinasen durch Glucose stimuliert wird [119,193], wodurch die DNA-Bindung von PDX-1 sowie die subzelluläre Lokalisation des Proteins reguliert wird [3,6,119,122,134]. Nachdem bewiesen wurde, dass die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 weder einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins noch auf die PDX-1/CK2-Interaktion hat, wurde untersucht, in wie weit die CK2 über Phosphorylierung von PDX-1, zusätzlich zu den bereits bekannten Kinasen, eine Rolle für die Transkription von PDX-1-Zielgenen spielt. PDX-1 übernimmt in der Regulation der untersuchten Promotoren (Insulin, Glucokinase und GLUT2) eine essentielle Aufgabe [159,219,223], wodurch die potentielle Auswirkung einer PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 somit ebenfalls von Bedeutung für Aktivierung der Promotoren sein könnte. Die Funktionalität der untersuchten Promotoren spielt eine übergeordnete Rolle für die Glucosehomöostase der pankreatischen β -Zelle. Somit ist die Analyse eines Einflusses der CK2 auf deren Aktivität notwendig, um die Frage nach der Funktion der Proteinkinase CK2 im Insulinmetabolismus zu klären. Zum besseren Verständnis der untersuchten PDX-1-Zielgene wird deren komplexe Regulation im Folgenden kurz dargestellt:

Das bekannteste PDX-1-Zielgen ist Insulin. Die Insulingenexpression wird über dessen Promotoraktivität durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an "Enhancer-Regionen" kontrolliert [172]. In intensiven Studien konnten viele wichtige Kontrollelemente und die dazugehörigen DNA-Bindeproteine, welche die Insulingentranskription regulieren, identifiziert werden. Der Insulinpromotor besitzt 5 wichtige Kontrollelemente innerhalb der 300 bp flankierenden Start-Region der Gentranskription. Es gibt 2 AT-reiche Elemente, die Homeodomänenproteine wie PDX-1 binden und 2 E-Elemente, die "helix-loop-helix-Proteine", wie zum Beispiel die E2A-Proteine E47/E12, oder das β -Zell spezifische Protein BETA2/NeuroD1 binden. Beide Proteinarten arbeiten in synergistischer Art und Weise miteinander zur Verstärkung der Insulingentranskription [208]. Eine genaue Charakterisierung dieser Regionen zeigt, dass die β -Zell spezifische Expression hauptsächlich über die A3-, C1-, A2 und E-Elemente, deren Kernbindemotive evolutionär konserviert vorliegen, gesteuert werden. Dass diese Regionen essentiell für die Transkription des Insulins sind, zeigen Mutationsanalysen innerhalb der Regionen, die in einem Verlust von 75% der

Insulinpromotoraktivität führen, wohingegen Mutationen an den übrigen Stellen des Promotors lediglich die Insulingentranskription leicht beeinflussen [57,90,172]. Die Bindung von PDX-1 an A-Elemente (A1-A4) des Ratten Insulin I Promotors stellt sich als wichtige Regulation für die Insulingenexpression sowie die Entwicklung pankreatischer β -Zellen heraus. Die Transaktivierung des Insulingens wird vermittelt durch 3 hochkonservierten Sequenzen, die sub-Domänen A, B und C (siehe Abbildung 2) im N-Terminus von PDX-1 [194]. PDX-1 bindet an das A3/A4 Element des Ratten Insulin I Promotors und aktiviert die Insulingentranskription durch Kooperation mit dem basischen "helix-loop-helix-Protein" E47/Pan1, welches an das E2-Element des Promotors bindet [160]. Die Homeodomäne des PDX-1-Gens agiert als Protein-Protein-Interaktionsdomäne und rekrutiert eine Vielzahl weitere Proteine, wie MafA [10,89,91], BETA2/NeuroD1 [30,32,155], Bridge-1 [216] sowie dem "high-mobility group protein I" zu einem Aktivierungskomplex auf dem E2-A3/4-Enhancer des Promotors [59]. Expressionsanalysen mit BETA2/NeuroD1, E2A und PDX-1 weisen darauf hin, dass BETA2 die wichtigste Rolle bei der Regulation der Insulingentranskription spielt, in dem es hauptsächlich mit PDX-1 agiert. Dieses Phänomen zeigt, dass die transkriptionelle Aktivität des Promotors aus der Verbindung einer Vielzahl von Aktivierungsdomänen resultiert, die mit anderen Coaktivatoren die basale Transkriptionsmaschinerie bilden. Studien an isolierten Inseln aus Ratten zeigten, dass Glucose die Bindung von PDX-1 an den Insulinpromotor [120], die Insulingentranskription und -sekretion stimuliert und die β -Zell Apoptose unterdrückt [73]. Werden β -Zellen kurze Zeit einem Hochglucosestimulus ausgesetzt, wird die Insulingenexpression stimuliert. Eine chronische Anreicherung erhöhter Glucosekonzentrationen hat eine gegensätzliche Auswirkungen auf viele β -Zell Funktionen, eingeschlossen der Transkription des Insulingens. Dies scheint mit der PDX-1-Genexpression zu korrelieren und seiner Fähigkeit an den Insulinpromotor zu binden. Der Verlust der PDX-1-Funktion oder Veränderungen im PDX-1-Gen aufgrund Mutationen sowie funktioneller Störung der Transkriptionsfaktoren, welche die PDX-1-Expression kontrollieren, können zu Diabetes mellitus führen [136].

Ein weiteres Zielgen von PDX-1 ist die Glucokinase. Dabei handelt es sich um einen wichtigen Faktor in der Übertragung des Phosphates von ATP auf Glucose für die Bildung von Glucose-6-Phosphat im Glucosemetabolismus. Die höchste Expression der Glucokinase wurde in pankreatischen β -Zellen und Leberhepatozyten gefunden [188]. Glucokinase fungiert als Glucosesensor in der β -Zelle und befördert in der Zelle ankommende Glucose in die Glycolyse. In der Leber ist Glucokinase in der Speicherung von Glucose als Glycogen involviert. Heterozygote Mutationen des Enzyms sind mit MODY2 verbunden [27,143,204].

Eine Kombination aus reduzierter Glucose-stimulierter Insulinsekretion in β -Zellen und reduzierter Glycogenspeicherung in der Leber führt zu einem erhöhten Plasmaglucosegehalt. Eine homozygote Mutation der Glucokinase resultiert in einem kompletten Genverlust und wurde bereits mit neonatalem Diabetes assoziiert [156]. Watada *et al.* [223] zeigten, dass der Promotor des Glucokinase-Gens verschiedene Kontroll-Motive besitzt, von denen 2 eine übergeordnete Rolle zu spielen scheinen: die palindrome Struktur hPal-1 und das hUPE3-Motiv. Für die Aktivierung der Glucokinasegentranskription bindet PDX-1 an dieses hUPE3-Motiv [74], genau wie BETA2/NeuroD1 [145].

GLUT2 ist ein Membranprotein, welches die Glucosediffusion über die Membran von Säugerzellen erleichtert. Außer Glucose kann auch Fructose oder Galaktose im Rahmen der physiologischen Konzentrationen von GLUT2 transportiert werden [107]. Das GLUT2-Gen wird in Leber, Dünndarm, Niere, in einigen Gehirnnarealen sowie den pankreatischen β -Zellen exprimiert. Die Lokalisation des GLUT2 auf der Zelloberfläche wird durch Glucose reguliert. Nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit transloziert GLUT2 aus intrazellulären Vesikeln zur apikalen Membran [107]. Eine permanente apikale Lokalisation von GLUT2 führt zur erhöhter Zuckeraufnahme in die Zelle, was eine der Charakteristiken experimenteller Diabetes und Insulinresistenzstadien ist [93]. GLUT2 detektiert das Vorhandensein extrazellulärer Glucose, unabhängig vom Glucosemetabolismus des übrigen Organismus und leitet dieses Signal weiter, wodurch zelluläre Funktionen, wie unter anderem die Insulinsekretion in β -Zellen, angeschaltet werden [107]. Bei Diabetes mellitus korreliert die verminderte Insulinsekretion mit einer reduzierten Expression von GLUT2 in β -Zellen, jedoch nicht in Leber oder Niere. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, dass die Expression des GLUT2-Gens von verschiedenen Faktoren in den β -Zellen des Pankreas, unabhängig von anderen GLUT2-exprimierenden Geweben, reguliert wird [23]. Bei Diabetes mellitus kann eine verminderte GLUT2-Expression beobachtet werden, wobei der Verlust der GLUT2-Genexpression in pankreatischen Inseln mit einem Verlust der PDX-1-Transaktivierungsfunktion bezüglich des GLUT2-Gens einhergeht [219]. Inselzellen verlieren somit auch ihre Glucosesensitivität [21]. Waeber *et al.* [219] konnten zeigen, dass PDX-1 über ein TAAT-Motiv (5'-TAATA-ATAACA-3'), welches unter einer Vielzahl von Spezies konserviert vorliegt, auf den GLUT2-Promotor einwirkt. Neben PDX-1 spielt das Inselzell-spezifische DNA-Bindeprotein GTIIa ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation von GLUT2 [74].

Mittels Reporterassays wurde die Glucoseabhängigkeit des Insulin-, Glucokinase- und GLUT2-Promotors in MIN6-Zellen analysiert. Als Resultat zeigte sich für jeden der Promotoren ein spezifischer Aktivitätszeitraum nach Glucosestimulation. Der Insulin-

promotor zeigte im Untersuchungszeitraum zweimal eine Aktivitätssteigerung, ähnlich zu dem biphasischen Verlauf der Insulinausschüttung in der Zelle. Unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme kommt es zu einem ersten Maximum der Insulinausschüttung, die auf der Freisetzung von in Granula gespeichertem Insulin im Rahmen der Glucose-stimulierten Insulinsekretion aus der β -Zelle beruht. Des Weiteren wird durch den Glucosestimulus der β -Zelle die Transkription des Insulingens durch Transkriptionsfaktoren wie PDX-1, Bridge-1, BETA2/NeuroD1 und MafA initiiert [104,159,216], woraufhin Insulin für eine erneute Sekretion synthetisiert wird. Diese Aktivitätserhöhung des Insulinpromotors könnte im zeitlichen Rahmen, in die mittels Luciferase-Assay ermittelten Aktivitätszeiträume fallen. Das die Insulinausschüttung in der β -Zelle nach Glucosestimulus beschriebenermaßen oszilliert [141], kann ebenfalls eine Erklärung für das erhaltene Aktivitätsprofil sein. In der Literatur wird in den meisten Fällen nur die Insulinausschüttung auf einen Glucosereiz hin innerhalb von 30 Minuten analysiert. Da auch Meng *et al.* in Reporterassaystudien eine Aktivierung des Insulinpromotors nach 24 Stunden feststellen konnten [138], scheint es neben dem in der Literatur beschriebenen kurzen Aktivitätszeitraum auch noch eine anhaltende Wirkung von Glucose auf den Insulinpromotor zu geben, für den vermutlich der lang anhaltende Glucosestimulus der MIN6-Zellen verantwortlich ist. Deutlich verlängerte hyperglykämische Bedingungen können zu einer Störung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion führen [37,43,126], welche mit einer Verminderung des Insulingehaltes aufgrund reduzierter PDX-1-Bindungsaktivität [136] sowie der Abnahme der Insulinbiosynthese und dem Proinsulin mRNA-Gehalt der Zelle assoziiert sind [126]. Der Glucokinasepromotor zeigt wie Insulin eine zunehmende Aktivitätssteigerung im untersuchten Zeitraum. Da die Glucokinase als glykolytisches Enzym am Anfang des Glucosemetabolismus in der β -Zelle steht, macht die frühe Steigerung der Aktivität des Promotors nach Glucosestimulation Sinn. Der GLUT2-Promotor wird insgesamt angesichts der Standardabweichungen nur schwach durch den Glucosestimulus angeschaltet. Es sind nur geringe Aktivitätsmaxima über den Untersuchungszeitraum hinweg zu vermerken. Die leichte frühe Aktivität des Promotors ist möglicherweise damit zu erklären, dass auf den Glucosestimulus der β -Zellen hin relativ schnell GLUT2 aus intrazellulären Granula zur apikalen Membran transloziert, wo es als Transporter für Glucose in die β -Zelle dient [107]. Gleichzeitig könnte die GLUT2-Gentranskription angeschaltet werden, um eine ausreichende Menge an GLUT2 in der Zelle zu gewährleisten. Für jeden Promotor konnten somit Aktivitätszeiträume unter Glucosestimulation nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der Aktivität für jeden Promotor spezifisch ist.

In der Literatur gibt es bereits Hinweise darauf, dass die CK2 eine übergeordnete Rolle in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels spielt. Ihr Mitwirken an der Regulation der Insulinproduktion und -sekretion sowie der Regulation des Insulinrezeptors oder von Enzymen, die im Metabolismus involviert sind, ist belegt [4]. Zur Analyse der Auswirkung der Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 auf die Transkriptionsregulation von PDX-1-Zielgenen wurde die Promotoraktivität unter CK2-Überexpression mit CK2 α - und CK2 β -Konstrukten bei gleichzeitiger Glucosestimulation analysiert. Für den Insulin- und Glucosekinasepromotor zeigte sich nach Glucosebehandlung eine kontinuierliche Aktivitätssteigerung im Zeitraum von 24 Stunden. Der GLUT2-Promotor hingegen weist ein frühes Aktivitätsmaximum nach Glucosestimulation auf. Der Nachteil bei einer CK2-Überexpression besteht hauptsächlich darin, dass durch das ubiquitäre Vorkommen der CK2 in der Zelle sowie der Vielzahl von Substraten in der Proteinkinase nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch andere β -Zell Proteine durch die Überexpression aktiviert werden, die einen indirekten Effekt auf die Aktivität der Promotoren ausüben könnten. In der Literatur gibt es bereits Beispiele für Proteine, die infolge einer CK2-Phosphorylierung fähig sind, als Transkriptionsfaktoren wirksam zu sein [5,9]. Dadurch kann nicht eindeutig darauf geschlossen werden, ob der erhaltene Effekt auf der Phosphorylierung von PDX-1 allein beruht. Zusätzlich müsste experimentell bestätigt werden, dass die Überexpression der CK2 auch tatsächlich eine erhöhte PDX-1-Phosphorylierung zur Folge hat. Auch die Grundaktivität der FLAG-Leervektoren muss in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Alternativ wurde die Aktivität des Insulin-, Glucokinase- und GLUT2-Promotors nach Behandlung mit dem CK2 Hemmstoff CX-4945 untersucht. Für den Insulinpromotor konnte ein deutliches Aktivitätsmaximum nachgewiesen werden, für den Glucokinase- und den GLUT2-Promotor war kein signifikanter Einfluss auf die Aktivität zu vermerken. Die Experimente nach CK2-Inhibition mit CX-4945 und die Überexpression der CK2 zeigen unterschiedliche Ergebnisse, was dadurch erklärt werden könnte, dass die spezifische Regulation der einzelnen Promotoren vom Phosphorylierungsstatus von PDX-1 durch die CK2 abhängt. Der Insulinpromotor konnte zusammenfassend sowohl nach Hemmung der CK2 als auch nach Überexpression zu unterschiedlichen Zeiten angeschaltet, werden, was ein Indiz dafür ist, dass er sowohl durch erhöhte Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 als auch durch eine verminderte Phosphorylierung beeinflusst werden könnte. Dieses Resultat ist widersprüchlich zu den Ergebnissen, die im Zusammenhang mit der Aktivität der CK2 sowie der Bindung von PDX-1 und CK2 unter Glucose erhalten wurden. Wenn Glucose die Aktivität der CK2 stimuliert, was im CK2-Aktivitätsassay gezeigt werden konnte, und eine

ebenfalls bestätigte Bindung von PDX-1 und CK2 unter Glucose vorliegt, würde unter Berücksichtigung der Daten von Meng *et al.* [139,140] erwartet werden, dass die Insulingentranskription durch die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 vermindert wird. Diese Annahme ist ein weiterer Kritikpunkt, der die mittels CK2-Überexpression erhaltenen Daten infrage stellt. Alternativ gäbe es auch die Möglichkeit, dass durch den hohen Glucosestimulus zunächst weiterhin viel Insulin produziert wird, das im endoplasmatischen Retikulum nicht prozessiert werden kann. ER-Stress durch anhaltende Hyperglykämie führt in den β -Zellen bekanntermaßen zu oxidativem Stress [36,76,161], weshalb die Insulinproduktion folglich nach einer gewissen Zeit auch zum Erliegen kommt. Zu den spezifischen Analysen mit dem CK2-Hemmstoff würde die Theorie jedoch passen, da hier festgestellt werden konnte, dass nach CK2-Hemmung eine erhöhte Insulingentranskription vorliegt. Der Glucokinase- und GLUT2-Promotor hingegen wurden lediglich nach CK2-Überexpression aktiviert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass deren Aktivität eine CK2-Hyperphosphorylierung von PDX-1 erfordern könnte. Die Einordnung der erhaltenen Daten betreffend eines Einflusses der CK2-Phosphorylierung von PDX-1 auf die Zielgene Insulin, Glucokinase und GLUT2 in einen Literatur-bekanntem Hintergrund stellt sich als schwierig heraus. Hauptsächlich ist diese Aussage darin begründet, dass es in der Literatur viele unterschiedliche Meinungen bezüglich der Regulation der einzelnen Zielgene gibt. Es gibt zwar viele Autoren, welche die Abhängigkeit der Regulation von Insulin, Glucokinase und GLUT2 durch den pankreatischen Transkriptionsfaktor PDX-1 mit experimentellen Daten belegen [159,219,223], aber einige Autoren vertreten auch gegensätzliche Meinungen: Zum Beispiel wurde die Bindung von PDX-1 an eine Vielzahl von β -Zell spezifischen Genen, darunter auch Insulin, Glucokinase und GLUT2, *in vitro* gezeigt. Mithilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen in β -TC3-Zellen wurde von Chakrabarti *et al.* analysiert, welche der Faktoren tatsächlich auch *in vivo* eine Assoziation mit PDX-1 eingehen. Die Bindung von PDX-1 an die Promotoren von Insulin, IAPP ("Islet Amyloid Polypeptide"), Glucagon, PDX-1 und Pax4 konnte bestätigt werden. Unter diesen Bedingungen war jedoch keine Assoziation von PDX-1 mit dem GLUT2-, dem Glucokinase und dem Albumin-Promotor in β -Zellen zu erkennen. Diese Arbeit lässt vermuten, dass die korrekte Struktur des Chromatins ausschlaggebend für die Promotorbindung von PDX-1 ist [31]. Als weiteres Beispiel sind Kajimoto *et al.* der Meinung, dass PDX-1 bei der Transkription des Insulins kein essentieller Faktor ist, da hohe Insulin mRNA-Level auch nach Aktivitätsreduktion von PDX-1 festgestellt wurden [87]. Hochglucosebedingungen in β -Zellen vermindern hauptsächlich die Bindungsaktivität von PDX-1 und MafA. Experimente mit antisense-PDX-1-Oligonukleotiden zeigten eine

Verminderung der PDX-1-Expression. Überraschenderweise trat keine Verminderung des mRNA-Gehaltes von Insulin, Glucokinase und IAPP auf [74]. Weiterhin ist neusten Studien zufolge GLUT2, zumindest in humanen pankreatischen β -Zellen, nicht der Hauptglucosetransporter. Quantitative Expressionsprofile zeigen, dass GLUT1 und GLUT3 ebenfalls eine essentielle Rolle spielen [133]. Nach Analyse dieser vielzähligen Aussagen scheint die Abhängigkeit von PDX-1 auf die Regulation der beschriebenen Zielgene zum einen stark davon abhängig zu sein, ob die Analysen *in vitro*, oder *in vivo* durchgeführt worden sind und zum anderen beruhen manche Aussagen auf der Verwendung spezifischer Zellsysteme. Universell geltende Aussagen über die PDX-1-Regulation der beschriebenen Zielgene sind deshalb kaum möglich und auch nur schwer zu vergleichen. Somit lässt sich betreffend der Reporterstudien an Insulin, Glucokinase und GLUT2 lediglich vermuten, dass die CK2 möglicherweise über PDX-1-Hyper- bzw. Hypophosphorylierung in pankreatischen β -Zellen dazu fähig ist, die Transkription der beschriebenen Zielgene Glucose-abhängig zu regulieren. Als weitere Regulationsmöglichkeit der CK2 auf die beschriebenen Promotoren könnte untersucht werden, ob die beschriebenen Cofaktoren von PDX-1 [59,104,159,216] Substrate oder Bindungspartner der CK2 sind und phosphorylierungsabhängig beeinflusst werden könnten. PDX-1 arbeitet wie bereits beschrieben kooperativ mit diesen Faktoren, zum Beispiel mit MafA, BETA2/NeuroD2 betreffend der Regulation des Insulinpromotors, und ist nicht der alleinige Faktor der Gentranskription [104,159,216]. Vielleicht wird auch die Interaktion von PDX-1 mit diesen Cofaktoren über die CK2-Phosphorylierung reguliert. Diese Punkte müssten zukünftig analysiert werden, um den Einfluss der CK2 auf die Aktivität der Promotoren eindeutig zu klären.

Aufgrund der von Meng *et al.* [138,139] beschriebenen Rolle der CK2 bei der Transkription des Insulingens in pankreatischen β -Zellen wäre eine zusätzliche Funktion der Phosphorylierung von PDX-1 durch CK2 bei der Sekretion des Hormons denkbar. Dieser Gedanke wird durch die bereits im Zusammenhang mit den oben aufgelisteten Literaturdaten gestützt, die einen Einfluss der CK2 in Insulin-vermittelten Signalwegen zeigen [39,202,202]. Die in der Dissertation verwendeten Glucose-responsiven MIN6-Zellen zeigen eine Insulinsekretion nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen [79], die auf eine Erhöhung des Calciumgehaltes nach Stimulation mit Hochglucose (25 mM) zurückzuführen ist [144]. Mithilfe eines ELISA-Tests konnte festgestellt werden, dass der Insulingehalt der MIN6-Zellen nach Glucosestimulation sowohl mit als auch ohne CK2-Inhibition stetig ansteigt. Ein signifikanter Unterschied der Versuchsansätze war jedoch nicht zu erkennen. Es besteht die Möglichkeit, dass gar kein direkter Einfluss der CK2 auf die

Insulinsekretion vorliegt, sondern ein indirekter über die Regulation des intrazellulären Calciumgehaltes der β -Zelle. Die Insulinsekretion wird *in vivo* über die intrazelluläre Calciumkonzentration als Antwort auf eine hohe Glucosekonzentration in der Zelle reguliert. PDX-1 steuert die Transkription eines Gens, das für den Calciumsensor Synaptotagmin 1 codiert (Syt1), lokalisiert in Insulin-sekretorischen Granula, mit zentraler Rolle in der Insulinsekretion [154]. Die PDX-1-Aktivierung ist unabhängig vom intrazellulären Calciumgehalt [121]. Der Insulingehalt wird bestimmt über die Exocytoserate Insulin-enthaltender "Large dense core vesicles" zur Plasmamembran, wo sie an einen Multiprotein-SNARE-Komplex ("Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor") binden. Die Fusion der 2 Membranen erfolgt nur in Anwesenheit von Calciumionen unter Einwirkung von Calciumsensorproteinen wie den Synaptotagminen [56]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung des PDX-1-Gehaltes mittels siRNA eine Reduktion der Syt1-Transkription in Insulinoma-Zellen zur Folge hat. Dadurch kann gefolgert werden, dass PDX-1 *in vivo* über eine Aktivierung der Syt1-Expression an der Insulinsekretion beteiligt ist [154]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von Syt1 unbeeinflusst von der Glucosekonzentration ist. Bezüglich des CK2-Einflusses auf Syt1 konnte weder nach CK2-Inhibition mit Quinalizarin bei gleichzeitiger Glucosestimulation, noch nach vorheriger Transfektion der Zellen mit der PDX-1-Phosphorylierungsmutante_{T231A/S232A} im Vergleich zum PDX-1-Wildtyp-Konstrukt eine signifikante Veränderung der Transkriptmenge von Syt1 detektiert werden. Die detailliertere Analyse mit der sensitiveren Methode der qRT-*Real Time*-PCR lieferte ebenfalls sowohl nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen, noch nach gleichzeitiger CK2-Hemmung mit Quinalizarin einen signifikanten Unterschied in der Syt1 mRNA-Menge. Somit kann eine indirekte Auswirkung der CK2 auf die Insulinsekretion über das PDX-1-Zielgen Syt1 ausgeschlossen werden. Die Synaptotagmin-Genfamilie besteht insgesamt aus 15 Mitgliedern, die alle als Calciumsensoren die Insulinexocytose in Neuronen und endokrinen pankreatischen Zellen regulieren. Neben Syt1 spielen Syt7 und Syt9 ebenfalls eine wichtige Rolle als Mediatoren der Glucose-stimulierten Insulinsekretion. Eventuell wäre dies ein Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen bezüglich der Fragestellung nach einem CK2-Einfluss auf die Insulinsekretion. Zudem scheint es wichtig zu sein, native Inselpräparationen für Experimente bezüglich der Rolle der Synaptotagmine zu verwenden, statt klonale Zelllinien. Es gibt Vermutungen, dass Syt1 vor allem in Insulinoma-Zellen eine Rolle spielt, da es in primären β -Zellen nicht detektiert werden kann [25,55,100]. Die Funktion der einzelnen Synaptotagmine gilt es in Zukunft eingehend zu erforschen.

Mit den bisher erhaltenen Experimenten kann eine Funktion der PDX-1/CK2-Assoziation für die Regulation der subzelluläre Lokalisation oder der Expression von PDX-1 ausgeschlossen werden. Neben der Synthese eines Proteins spielt auch sein Abbau eine wichtige Rolle. Am Abbau von PDX-1 ist das Protein PCIF-1 beteiligt, welches im C-Terminus von PDX-1 bindet [111,112]. PCIF-1 ist ein nukleärer Faktor, der das PDX-1-Transaktivierungspotential inhibiert, wodurch PDX-1 für die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation markiert wird [33,111,112]. PCIF-1 kommt in vielen Organen, wie Herz, Niere, Leber und Lunge vor. Die höchste Expression erreicht das Protein jedoch im Pankreas, in adulten pankreatischen β -Zellen. Das PCIF-1 Gen codiert für ein Protein mit 374 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, welches eine N-terminale TRAF-Domäne besitzt (Aminosäuren 36-142) sowie eine POZ-Domäne (Aminosäuren 190-297). PCIF-1 ist evolutionär konserviert und zeigt 100% Identität mit dem humanen SPOP ("Speckle-type Protein") welches in einer HeLa-Zell cDNA-Bank entdeckt wurde [153]. In einem Hefe-2-Hybrid Screen konnte eine Interaktion von PCIF-1 mit PDX-1 festgestellt werden. Bislang konnte eine Wechselwirkung der Proteine unter *in vitro*-Bedingungen sowie eine schwache, aber reproduzierbare endogene Interaktion in den pankreatischen Insulinoma-Zelllinien MIN6 und β -TC3 nachgewiesen werden [111,112]. Die humane PDX-1-Mutation E224K, welche mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist, zeigt die verminderte Fähigkeit von PCIF-1 die PDX-1-Transaktivierung zu hemmen, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Interaktion von PDX-1 und PCIF-1 wichtig für eine normale Glucosehomöostase ist. Die Transaktivierungs-Inhibition erfolgt über die klassische Rolle von POZ-Domänen-Proteinen, die Rekrutierung von Co-Repressoren und Histon Deacetylasen [112]. Über die Interaktion von PCIF-1 mit PDX-1 spielt das Protein eine indirekte Rolle in der Regulation der Insulingentranskription. Eine Überexpression von PCIF-1 inhibiert zum Beispiel die Ratten Insulinpromotoren I und II in MIN6-Zellen. Ein "Knock-out" von PCIF-1 erhöht den PDX-1-Proteingehalt in murinen β -Zellen [111]. Die genaue Analyse der Bindungsstelle von PCIF-1 innerhalb des C-Terminus von PDX-1 stellt eine Verbindung des PDX-1/PCIF-1-Komplexes mit der Proteinkinase CK2 her, da der Bindungsbereich an PDX-1 die beiden PDX-1-Phosphorylierungsstellen für die CK2 (Threonin an Position 231 und Serin an Stelle 232) umfasst. Immunfluoreszenz-Färbungen von PCIF-1 in Schnitten adulter Mauspankrea zeigen ein ähnliches Expressionsmuster wie PDX-1. Zusätzlich gibt es Daten, die auf eine Colokalisation von PCIF-1 mit Insulin hinweisen. Aufgrund dieser Resultate wird daraus geschlossen, dass PDX-1 und PCIF-1 in β -Zellen colokalisiert vorliegen [111]. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Assoziation von PDX-1 mit PCIF-1 in primären Mausinseln

nachgewiesen werden. Obwohl eine Interaktion von PDX-1 mit PCIF-1 schon lange bekannt ist [111], konnte bislang kein Glucoseeinfluss auf die Interaktion nachgewiesen werden. Mittels Coimmunpräzipitation konnte lediglich die Bindung zwischen PDX-1 und PCIF-1 bestätigt werden, eine Abhängigkeit von Glucose oder ein CK2-Einfluss waren jedoch nicht zu verzeichnen. Ähnlich wie bei der Interaktionsanalyse von PDX-1 und CK2 wurde als weiteres Verfahren der PLA als sensitivere Analysemethode für diese Fragestellung herangezogen. Hierbei war es möglich festzustellen, dass die PCIF-1/PDX-1-Interaktion in MIN6-Zellen nach Stimulation mit Hochglucose bei gleichzeitiger CK2-Hemmung mit CX-4945 deutlich erniedrigt war im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Assoziation von PDX-1 und PCIF-1 zum einen von der Glucosekonzentration in der Zelle abhängig ist und zum anderen von der PDX-1-Phosphorylierung durch die CK2 beeinflusst wird. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass sich die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 förderlich auf die Interaktion mit PCIF-1 im C-Terminus des Proteins auswirkt, wodurch es zu einer Verringerung der Insulingentranskription in pankreatischen β -Zellen kommt.

PDX-1 ist eines der besten Beispiele für Schlüsselregulatoren in der β -Zelle, welche die Funktionen innerhalb der Zelle je nach Bedarf regulieren können. Von Wachstum und Differenzierung während der Embryogenese bis hin zur Regulation von Genen, welche für den Erhalt der Glucosehomöostase der β -Zelle wichtig ist, übernimmt der Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Aufgaben. Dieses breite Wirkungsspektrum macht PDX-1 zu einem attraktiven Ziel für die Therapie von Erkrankungen, die mit einer Dysregulation der β -Zell Funktion einhergehen. In der Literatur sind bereits einige Ansätze dargelegt, in wie weit eine Therapie mittels PDX-1 möglich wäre. Die ektopische Expression von PDX-1 zusammen mit weiteren Cofaktoren, die eine essentielle Rolle bei der Transkription des Insulingens spielen, kann nicht pankreatische Zellen reprogrammieren, sodass sie sich wie β -Zellen verhalten und Insulin produzieren. Eine solche ektopische Expression von PDX-1 ist bereits in adulten Leberzellen und intestinalen Epithelien gelungen [50,99,212,232]. Auch humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark konnten durch Einbringen von PDX-1 dazu angetrieben werden sich zu funktionellen Insulin produzierenden Zellen zu differenzieren [109]. Die Fähigkeit der ektopischen PDX-1-Expression wurde von verschiedenen Gruppen in Versuchen mit adenoviralen Vektorkonstrukten für Gentransfer durchgeführt [18,98,220]. Diese Reprogrammierung in Insulin-sezernierenden Zellen wird als künftige therapeutische Behandlung von Diabetes mellitus Typ 1 vorgeschlagen, da die

Verfügbarkeit von Inselzellen zur Transplantation limitiert ist [3]. Aber auch die Fähigkeit der Regulation der Funktion von PDX-1 über posttranslationale Modifikationen, wie in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der PDX-1-Phosphorylierung durch die Proteinkinase CK2 gezeigt sowie der Einsatz spezifischer Kinase-Inhibitoren könnte als alternative Strategie der Diabetesbehandlung eingesetzt werden.

Die bisherigen Befunde über die Interaktion von PDX-1 und CK2 in den pankreatischen β -Zellen, vor allem die Glucoseabhängigkeit der Wechselwirkung beider Proteine, deuten bereits auf eine übergeordnete Rolle bei der Regulation der Glucose-abhängigen Insulingentranskription und -sekretion hin. Dennoch bleiben eine Reihe weiterer Fragen offen. Es ist essentiell zu überprüfen, welche Auswirkungen die Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 auf den Insulinpromotor hat. Außerdem wäre es wichtig zu erforschen, in wie weit die CK2-Phosphorylierung von PDX-1 einen Einfluss auf Interaktion mit weiteren Cofaktoren der Insulingentranskription, wie MafA, BETA2/NeuroD1 oder Bridge-1 ausübt. Untersuchungen zur Beteiligung der CK2 am Mechanismus der Insulinsekretion sind ebenfalls notwendig. Eine schematische Übersicht über zukünftige Forschungsansätze betreffend der Wechselwirkung von PDX-1 und CK2 sind in Abbildung 42 zusammengefasst. Nach detaillierter Charakterisierung der Interaktion von PDX-1 und CK2 auf Zellkulturebene, ist es unerlässlich, die erhaltenen Resultate auf ihre biologische Bedeutung im Tiermodell zu überprüfen. Neue Erkenntnisse zur Aufklärung der Regulation des Insulinmetabolismus sind essentiell für die Evaluation neuer Therapieoptionen für die Behandlung von Diabetes mellitus oder andere pankreatischer Dysfunktionen.

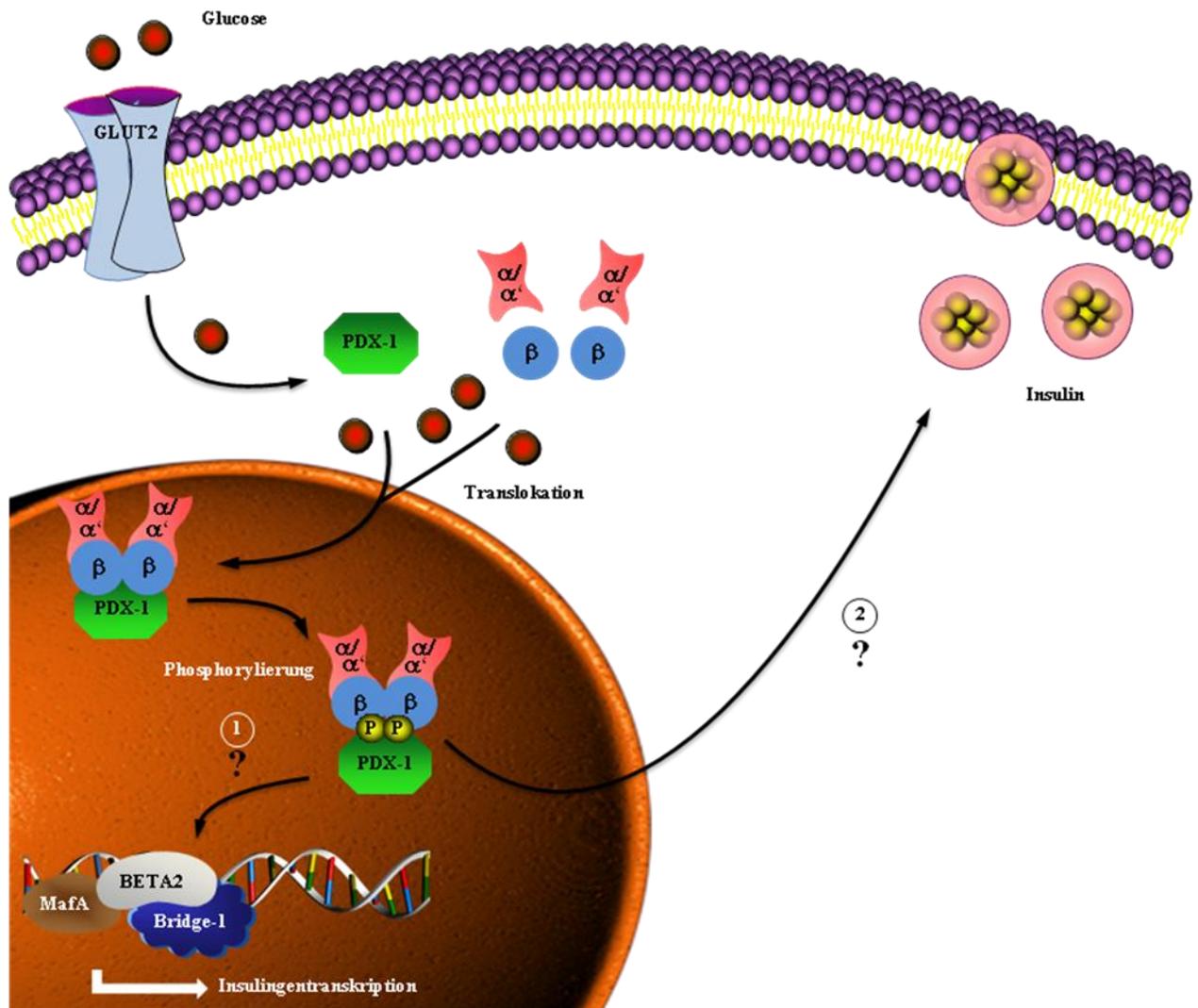


Abbildung 42: Schematische Darstellung zukünftiger Forschungsansätze im Rahmen der Interaktion von PDX-1 und CK2 in der pankreatischen β -Zelle. Neben Analysen zum Einfluss der CK2-Phosphorylierung von PDX-1 auf dessen Insulinpromotor-Bindungsverhalten ist es wichtig zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von PDX-1 durch die CK2 auch eine Auswirkung auf die kooperative Initiation von PDX-1 mit weiteren Cofaktoren der Insulingentranskription hat (1). Neben Analysen zur Transkription von Insulin wäre es essentiell zu kontrollieren, ob die CK2 parallel auch in die Sekretion des Hormons involviert ist (2).

8. Literaturverzeichnis

- [1] U. Ahlgren, J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu, H. Edlund, Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes, *Genes Dev.* 12 (1998) pp. 1763-1768.
- [2] K.A. Ahmad, G. Wang, G. Unger, J. Slaton, K. Ahmed, Protein kinase CK2- A key suppressor of apoptosis, *Adv. Enzyme Regul.* 48 (2008) pp. 179-187.
- [3] F. Al-Quobaili and M. Montenarh, Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2, *Int. J. Mol. Med.* 21 (2008) pp. 399-404.
- [4] F. Al-Quobaili and M. Montenarh, CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism, *Metabolism* 61 (2012) pp. 1512-1517.
- [5] E. Ampofo, T. Sokolowsky, C. Götz, M. Montenarh, Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1833 (2013) pp. 439-451.
- [6] R. An, X.G. daSilva, H.X. Hao, F. Semplici, J. Rutter, G.A. Rutter, Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) kinase of pancreatic duodenal homeobox-1 nuclear import in pancreatic beta-cells, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) pp. 791-793.
- [7] S.S. Andrali, Q. Qian, S. Ozcan, Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) pp. 15589-15596.
- [8] S.S. Andrali, M.L. Sampley, N.L. Vanderford, S. Ozcan, Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells, *Biochem. J.* 415 (2008) pp. 1-10.
- [9] P.L. Apopa, X. He, Q. Ma, Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22 (2008) pp. 63-76.
- [10] S. Aramata, S.I. Han, K. Kataoka, Roles and regulation of transcription factor MafA in islet beta-cells, *Endocr. J.* 54 (2007) pp. 659-666.

- [11] S. Ashizawa, F.C. Brunicardi, X.P. Wang, PDX-1 and the pancreas, *Pancreas* 28 (2004) pp. 109-120.
- [12] C.A. Aspinwall, W.J. Qian, M.G. Roper, R.N. Kulkarni, C.R. Kahn, R.T. Kennedy, Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta - cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 22331-22338.
- [13] R. Ballotti, Y. Le Marchand-Brustel, S. Gammeltoft, O.E. Van, Insulin receptor: tyrosine kinase activity and insulin action, *Reprod. Nutr. Dev.* 29 (1989) pp. 653-661.
- [14] J. Barrow, C.W. Hay, L.A. Ferguson, H.M. Docherty, K. Docherty, Transcription factor cycling on the insulin promoter, *FEBS Lett.* 580 (2006) pp. 711-715.
- [15] R. Battistutta, G. Cozza, F. Pierre, E. Papinutto, G. Lolli, S. Sarno, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, M. Haddach, K. Anderes, D.M. Ryckman, F. Meggio, L.A. Pinna, Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer, *Biochemistry* 50 (2011) pp. 8478-8488.
- [16] J.W. Baynes and S.R. Thorpe, Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1-9.
- [17] G.I. Bell and K.S. Polonsky, Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function, *Nature* 414 (2001) pp. 788-791.
- [18] I. Ber, K. Shternhall, S. Perl, Z. Ohanuna, I. Goldberg, I. Barshack, L. venisti-Zarum, I. Meivar-Levy, S. Ferber, Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 31950-31957.
- [19] A.C. Bibby and D.W. Litchfield, The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2beta, *Int. J. Biol. Sci.* 1 (2005) pp. 67-79.
- [20] H. Bonnet, O. Filhol, I. Truchet, P. Brethenou, C. Cochet, F. Amalric, G. Bouche, Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory β subunit of CK2 and

- directly stimulates CK2 activity toward nucleolin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) pp. 24781-24787.
- [21] C. Bonny, R. Roduit, S. Gremlich, P. Nicod, B. Thorens, G. Waeber, The loss of GLUT2 expression in the pancreatic beta-cells of diabetic db/db mice is associated with an impaired DNA-binding activity of islet-specific trans-acting factors, *Mol. Cell Endocrinol.* 135 (1997) pp. 59-65.
- [22] M.J. Boucher, L. Selander, L. Carlsson, H. Edlund, Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) pp. 6395-6403.
- [23] D.E. Bramblett, H.P. Huang, M.J. Tsai, Pancreatic islet development, *Adv. Pharmacol.* 47 (2000) pp. 255-315.
- [24] M. Brissova, M. Shiota, W.E. Nicholson, M. Gannon, S.M. Knobel, D.W. Piston, C.V. Wright, A.C. Powers, Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 11225-11232.
- [25] H. Brown, B. Meister, J. Deeney, B.E. Corkey, S.N. Yang, O. Larsson, C.J. Rhodes, S. Seino, P.O. Berggren, G. Fried, Synaptotagmin III isoform is compartmentalized in pancreatic beta-cells and has a functional role in exocytosis, *Diabetes* 49 (2000) pp. 383-391.
- [26] J.C. Bruning, J. Winnay, S. Bonner-Weir, S.I. Taylor, D. Accili, C.R. Kahn, Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles, *Cell* 88 (1997) pp. 561-572.
- [27] C.V. Burke, C.W. Buettger, E.A. Davis, S.J. McClane, F.M. Matschinsky, S.E. Raper, Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI), *Biochem. J.* 342 (Pt 2) (1999) pp. 345-352.
- [28] J. Buteau, R. Roduit, S. Susini, M. Prentki, Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells, *Diabetologia* 42 (1999) pp. 856-864.

- [29] M.E. Calvert, K.M. Keck, C. Ptak, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, L.F. Pemberton, Phosphorylation by casein kinase 2 regulates Nap1 localization and function, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) pp. 1313-1325.
- [30] J.H. Chae, G.H. Stein, J.E. Lee, NeuroD: the predicted and the surprising, *Mol. Cells* 18 (2004) pp. 271-288.
- [31] S.K. Chakrabarti, J.C. James, R.G. Mirmira, Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 13286-13293.
- [32] K. Chu, E. Nemoz-Gaillard, M.J. Tsai, BETA2 and pancreatic islet development, *Recent Prog. Horm. Res.* 56 (2001) pp. 23-46.
- [33] K.C. Claiborn, M.M. Sachdeva, C.E. Cannon, D.N. Groff, J.D. Singer, D.A. Stoffers, Pcif1 modulates Pdx1 protein stability and pancreatic beta cell function and survival in mice, *J. Clin. Invest* 120 (2010) pp. 3713-3721.
- [34] B.N. Cockburn, G. Bermano, L.L. Boodram, S. Teelucksingh, T. Tsuchiya, D. Mahabir, A.B. Allan, R. Stein, K. Docherty, G.I. Bell, Insulin promoter factor-1 mutations and diabetes in Trinidad: identification of a novel diabetes-associated mutation (E224K) in an Indo-Trinidadian family, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89 (2004) pp. 971-978.
- [35] G. Cozza, M. Mazzorana, E. Papinutto, J. Bain, M. Elliott, M.G. Di, A. Gianoncelli, M.A. Pagano, S. Sarno, M. Ruzzene, R. Battistutta, F. Meggio, S. Moro, G. Zagotto, L.A. Pinna, Quinalizarin as a potent, selective and cell-permeable inhibitor of protein kinase CK2, *Biochem. J.* 421 (2009) pp. 387-395.
- [36] P. Dandona, K. Thusu, S. Cook, B. Snyder, J. Makowski, D. Armstrong, T. Nicotera, Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus, *Lancet* 347 (1996) pp. 444-445.
- [37] A.M. Davalli, C. Ricordi, C. Socci, S. Braghi, F. Bertuzzi, B. Fattor, C. Di, V, A.E. Pontiroli, G. Pozza, Abnormal sensitivity to glucose of human islets cultured in a high glucose medium: partial reversibility after an additional culture in a normal glucose medium, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 72 (1991) pp. 202-208.

- [38] M. Daya-Makin, J.S. Sanghera, T.L. Mogentale, M. Lipp, J. Parchomchuk, J.C. Hogg, S.L. Pelech, Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung, *Cancer Res.* 54 (1994) pp. 2262-2268.
- [39] T.A. Diggle, C. Schmitz-Peiffer, A.C. Borthwick, G.I. Welsh, R.M. Denton, Evidence that insulin activates casein kinase 2 in rat epididymal fat-cells and that this may result in the increased phosphorylation of an acid-soluble 22 kDa protein, *Biochem. J.* 279 (Pt 2) (1991) pp. 545-551.
- [40] A. Donella-Deana, L. Cesaro, S. Sarno, M. Ruzzene, A.M. Brunati, O. Marin, G. Vilc, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, D.W. Litchfield, L.A. Pinna, Tyrosine phosphorylation of protein kinase CK2 by Src-related tyrosine kinases correlates with increased catalytic activity, *Biochem. J.* 372 (2003) pp. 841-849.
- [41] S. Dutta, M. Gannon, B. Peers, C. Wright, S. Bonner-Weir, M. Montminy, PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2001) pp. 1065-1070.
- [42] H. Edlund, Developmental biology of the pancreas, *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001) p.S5-S9.
- [43] D.L. Eizirik, G.S. Korbitt, C. Hellerstrom, Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function, *J. Clin. Invest* 90 (1992) pp. 1263-1268.
- [44] L.J. Elrick and K. Docherty, Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1, *Diabetes* 50 (2001) pp. 2244-2252.
- [45] D. Escalier, D. Silvius, X. Xu, Spermatogenesis of mice lacking CK2 α' : Failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus, *Mol. Reprod. Dev.* 66 (2003) pp. 190-201.
- [46] J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux, G.M. Grodsky, Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?, *Diabetes* 52 (2003) pp. 1-8.

- [47] S.S. Fajans, G.I. Bell, K.S. Polonsky, Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) pp. 971-980.
- [48] M. Faust, N. Schuster, M. Montenarh, Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin, *FEBS Letters* 462 (1999) pp. 51-56.
- [49] D. Feng, S. Welker, C. Korbel, J. Rudzitis-Auth, M.D. Menger, M. Montenarh, M.W. Laschke, Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions, *Angiogenesis*. 15 (2012) pp. 243-252.
- [50] S. Ferber, A. Halkin, H. Cohen, I. Ber, Y. Einav, I. Goldberg, I. Barshack, R. Seijffers, J. Kopolovic, N. Kaiser, A. Karasik, Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia, *Nat. Med.* 6 (2000) pp. 568-572.
- [51] F.T. Fiedorek, Jr. and E.S. Kay, Mapping of the insulin promoter factor 1 gene (Ipf1) to distal mouse chromosome 5, *Genomics* 28 (1995) pp. 581-584.
- [52] O. Filhol, A. Nueda, V. Martel, D. Gerber-Scokaert, M.J. Benitez, C. Souchier, Y. Saoudi, C. Cochet, Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual Subunits, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) pp. 975-987.
- [53] H.L. Ford, E. Landesmann-Bollag, C.S. Dacwag, P.T. Stukenberg, A.B. Pardee, D.C. Seldin, Cell cycle-regulated phosphorylation of the human SIX1 homeodomain protein, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 22245-22254.
- [54] Y. Gao, J. Miyazaki, G.W. Hart, The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 415 (2003) pp. 155-163.
- [55] Z. Gao, J. Reavey-Cantwell, R.A. Young, P. Jegier, B.A. Wolf, Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 36079-36085.

- [56] B.R. Gauthier and C.B. Wollheim, Synaptotagmins bind calcium to release insulin, *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295 (2008) p.E1279-E1286.
- [57] M.S. German and J. Wang, The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose, *Mol. Cell Biol.* 14 (1994) pp. 4067-4075.
- [58] G.G. Ginsberg, New developments in pancreatic cancer, *Semin. Gastrointest. Dis.* 11 (2000) pp. 162-167.
- [59] E. Glick, D. Leshkowitz, M.D. Walker, Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 2199-2204.
- [60] C.V.C. Glover, On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59 (1998) pp. 95-133.
- [61] C. Götz, C. Bachmann, M. Montenarh, Inhibition of protein kinase CK2 leads to a modulation of androgen receptor dependent transcription in prostate cancer cells, *The Prostate* 67 (2007) pp. 125-134.
- [62] G. Goudet, S. Delhalle, F. Biemar, J.A. Martial, B. Peers, Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 4067-4073.
- [63] J. Grande, M. Perez, E. Itarte, Phosphorylation of hepatic insulin receptor by casein kinase 2, *FEBS Lett.* 232 (1988) pp. 130-134.
- [64] G. Gu, J. Dubauskaite, D.A. Melton, Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors, *Development* 129 (2002) pp. 2447-2457.
- [65] B. Guerra, S. Siemer, B. Boldyreff, O.G. Issinger, Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles, *FEBS Letters* 462 (1999) pp. 353-357.
- [66] J.F. Habener and D.A. Stoffers, A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus, *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110 (1998) pp. 12-21.

- [67] A. Haga, Y. Niinaka, A. Raz, Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein, *Biochim. Biophys. Acta* 1480 (2000) pp. 235-244.
- [68] D. Hanahan, Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids., *J. Mol. Biol.* 166 (1983) pp. 557-580.
- [69] E.H. Hani, D.A. Stoffers, J.C. Chevre, E. Durand, V. Stanojevic, C. Dina, J.F. Habener, P. Froguel, Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus, *J. Clin. Invest* 104 (1999) p.R41-R48.
- [70] J.S. Harmon, C.E. Gleason, Y. Tanaka, E.A. Oseid, K.K. Hunter-Berger, R.P. Robertson, In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1995-2000.
- [71] K.F. Harris, E. Chang, J.B. Christensen, M.J. Imperiale, BK virus as a potential co-factor in human cancer, *Dev. Biol. Stand.* 94 (1998) pp. 81-91.
- [72] P.L. Herrera, Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages, *Development* 127 (2000) pp. 2317-2322.
- [73] A. Hoorens, M. Van de Casteele, G. Kloppel, D. Pipeleers, Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program, *J. Clin. Invest* 98 (1996) pp. 1568-1574.
- [74] H. Hui and R. Perfetti, Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002) pp. 129-141.
- [75] E. Huillard, L. Ziercher, O. Blond, M. Wong, J.C. Deloulme, S. Souchelnytskyi, J. Baudier, C. Cochet, T. Buchou, Disruption of CK2beta in embryonic neural stem cells compromises proliferation and oligodendrogenesis in the mouse telencephalon, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) pp. 2737-2749.

- [76] Y. Ihara, S. Toyokuni, K. Uchida, H. Odaka, T. Tanaka, H. Ikeda, H. Hiai, Y. Seino, Y. Yamada, Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes, *Diabetes* 48 (1999) pp. 927-932.
- [77] H. Inoue, A.C. Riggs, Y. Tanizawa, K. Ueda, A. Kuwano, L. Liu, H. Donis-Keller, M.A. Permutt, Isolation, characterization, and chromosomal mapping of the human insulin promoter factor 1 (IPF-1) gene, *Diabetes* 45 (1996) pp. 789-794.
- [78] J. Intemann, N.E.B. Saidu, L. Schwind, M. Montenarh, ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945, *Cell Signal.* 26 (2014) pp. 1567-1575.
- [79] H. Ishihara, T. Asano, K. Tsukuda, H. Katagiri, K. Inukai, M. Anai, M. Kikuchi, Y. Yazaki, J.I. Miyazaki, Y. Oka, Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets, *Diabetologia* 36 (1993) pp. 1139-1145.
- [80] A. Ishii, T. Nonaka, S. Taniguchi, T. Saito, T. Arai, D. Mann, T. Iwatsubo, S.I. Hisanaga, M. Goedert, M. Hasegawa, Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies, *FEBS Lett.* 581 (2007) pp. 4711-4717.
- [81] P. Itkin-Ansari, C. Demeterco, S. Bossie, D.D. de la Tour, G.M. Beattie, J. Movassat, M.I. Mally, A. Hayek, F. Levine, PDX-1 and cell-cell contact act in synergy to promote delta-cell development in a human pancreatic endocrine precursor cell line, *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) pp. 814-822.
- [82] M. Janeczko, M. Maslyk, R. Szyszka, A. Baier, Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors, *Mol. Cell Biochem.* 365 (2011) pp. 112-116.
- [83] J.D. Johnson, N.T. Ahmed, D.S. Luciani, Z. Han, H. Tran, J. Fujita, S. Mislser, H. Edlund, K.S. Polonsky, Increased islet apoptosis in Pdx1^{+/-} mice, *J. Clin. Invest* 111 (2003) pp. 1147-1160.
- [84] J.D. Johnson, E. Bernal-Mizrachi, E.U. Alejandro, Z. Han, T.B. Kalynyak, H. Li, J.L. Beith, J. Gross, G.L. Warnock, R.R. Townsend, M.A. Permutt, K.S. Polonsky, Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the

- human islet proteome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103 (2006) pp. 19575-19580.
- [85] J.C. Jonas, A. Sharma, W. Hasenkamp, H. Ilkova, G. Patane, R. Laybutt, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 14112-14121.
- [86] J. Jonsson, L. Carlsson, T. Edlund, H. Edlund, Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice, *Nature* 371 (1994) pp. 606-609.
- [87] Y. Kajimoto, H. Watada, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, J. Miyazaki, Y. Yamasaki, Suppression of transcription factor PDX-1/IPF1/STF-1/IDX-1 causes no decrease in insulin mRNA in MIN6 cells, *J. Clin. Invest* 100 (1997) pp. 1840-1846.
- [88] H. Kaneto, Y. Kajimoto, J. Miyagawa, T. Matsuoka, Y. Fujitani, Y. Umayahara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Y. Yamasaki, M. Hori, Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity, *Diabetes* 48 (1999) pp. 2398-2406.
- [89] H. Kaneto, T. Miyatsuka, Y. Fujitani, H. Noguchi, K.H. Song, K.H. Yoon, T.A. Matsuoka, Role of PDX-1 and MafA as a potential therapeutic target for diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77 Suppl 1 (2007) p.S127-S137.
- [90] O. Karlsson, T. Edlund, J.B. Moss, W.J. Rutter, M.D. Walker, A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related sequences within the enhancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84 (1987) pp. 8819-8823.
- [91] K. Kataoka, Multiple mechanisms and functions of maf transcription factors in the regulation of tissue-specific genes, *J. Biochem.* 141 (2007) pp. 775-781.
- [92] D. Kawamori, Y. Kajimoto, H. Kaneto, Y. Umayahara, Y. Fujitani, T. Miyatsuka, H. Watada, I.B. Leibiger, Y. Yamasaki, M. Hori, Oxidative stress induces nucleocytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase, *Diabetes* 52 (2003) pp. 2896-2904.

- [93] G.L. Kellett, E. Brot-Laroche, O.J. Mace, A. Leturque, Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2, *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008) pp. 35-54.
- [94] H. Kim, K. Choi, H. Kang, S.Y. Lee, S.W. Chi, M.S. Lee, J. Song, D. Im, Y. Choi, S. Cho, Identification of a Novel Function of CX-4945 as a Splicing Regulator, *PLoS. ONE.* 9 (2014) p.e94978.
- [95] H.S. Kim, R. Mukhopadhyay, S.B. Rothbart, A.C. Silva, V. Vanoosthuyse, E. Radovani, T. Kislinger, A. Roguev, C.J. Ryan, J. Xu, H. Jahari, K.G. Hardwick, J.F. Greenblatt, N.J. Krogan, J.S. Fillingham, B.D. Strahl, E.E. Bouhassira, W. Edelmann, M.C. Keogh, Identification of a BET Family Bromodomain/Casein Kinase II/TAF-Containing Complex as a Regulator of Mitotic Condensin Function, *Cell Rep.* 6 (2014) pp. 892-905.
- [96] S.K. Kim and M. Hebrok, Intercellular signals regulating pancreas development and function, *Genes Dev.* 15 (2001) pp. 111-127.
- [97] J.K. Klarlund and M.P. Czech, Insulin-like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblasts., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) pp. 15872-15875.
- [98] H. Kojima, M. Fujimiya, K. Matsumura, P. Younan, H. Imaeda, M. Maeda, L. Chan, NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice, *Nat. Med.* 9 (2003) pp. 596-603.
- [99] H. Kojima, T. Nakamura, Y. Fujita, A. Kishi, M. Fujimiya, S. Yamada, M. Kudo, Y. Nishio, H. Maegawa, M. Haneda, H. Yasuda, I. Kojima, M. Seno, N.C. Wong, R. Kikkawa, A. Kashiwagi, Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin, *Diabetes* 51 (2002) pp. 1398-1408.
- [100] J. Lang, M. Fukuda, H. Zhang, K. Mikoshiba, C.B. Wollheim, The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium, *EMBO J.* 16 (1997) pp. 5837-5846.
- [101] M. Laramas, D. Pasquier, O. Filhol, F. Ringeisen, J.L. Descotes, C. Cochet, Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated

- with poor prognostic factors in human prostate cancer, *Eur. J. Cancer* 43 (2007) pp. 928-934.
- [102] P. Lebrun, M.R. Montminy, O.E. Van, Regulation of the pancreatic duodenal homeobox-1 protein by DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) pp. 38203-38210.
- [103] C. Ledent, J. Dumont, G. Vassart, M. Parmentier, Thyroid adenocarcinomas secondary to tissue-specific expression of simian virus-40 large T-antigen in transgenic mice, *Endocrinology* 129 (1991) pp. 1391-1401.
- [104] J.H. Lee, J.L. Volinic, C. Banz, K.M. Yao, M.K. Thomas, Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1, *J. Endocrinol.* 187 (2005) pp. 283-292.
- [105] J. Leonard, B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, M.R. Montminy, Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) pp. 1275-1283.
- [106] J. Leonard, B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, M.R. Montminy, Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) pp. 1275-1283.
- [107] A. Leturque, E. Brot-Laroche, G.M. Le, GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing, *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 296 (2009) p.E985-E992.
- [108] D. Li, L. Chen, Z. Hu, H. Li, J. Li, C. Wei, Y. Huang, H. Song, L. Fang, Alterations of microRNAs are associated with impaired growth of MCF-7 breast cancer cells induced by inhibition of casein kinase 2, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) pp. 4008-4015.
- [109] Y. Li, R. Zhang, H. Qiao, H. Zhang, Y. Wang, H. Yuan, Q. Liu, D. Liu, L. Chen, X. Pei, Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells, *J. Cell Physiol* 211 (2007) pp. 36-44.

- [110] K.Y. Lin, C. Tai, J.C. Hsu, C.F. Li, C.L. Fang, H.C. Lai, Y.C. Hseu, Y.F. Lin, Y.H. Uen, Overexpression of Nuclear Protein Kinase CK2 alpha Catalytic Subunit (CK2alpha) as a Poor Prognosticator in Human Colorectal Cancer, PLoS ONE. 6 (2011) p.e17193.
- [111] A. Liu, B.M. Desai, D.A. Stoffers, Identification of PCIF1, a POZ domain protein that inhibits PDX-1 (MODY4) transcriptional activity, Mol. Cell Biol. 24 (2004) pp. 4372-4383.
- [112] A. Liu, J. Oliver-Krasinski, D.A. Stoffers, Two conserved domains in PCIF1 mediate interaction with pancreatic transcription factor PDX-1, FEBS Lett. 580 (2006) pp. 6701-6706.
- [113] Y. Liu, R.J. MacDonald, G.H. Swift, DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex, J. Biol. Chem. 276 (2001) pp. 17985-17993.
- [114] Z. Liu, K. Tanabe, E. Bernal-Mizrachi, M.A. Permutt, Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3beta have reduced beta cell mass and proliferation, Diabetologia 51 (2008) pp. 623-631.
- [115] G. Lolli, L.A. Pinna, R. Battistutta, Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization, ACS Chem. Biol. 7 (2012) pp. 1158-1163.
- [116] D.Y. Lou, I. Dominguez, P. Toselli, E. Landesman-Bollag, C. O'Brien, D.C. Seldin, The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development, Mol. Cell Biol. 28 (2008) pp. 131-139.
- [117] F.J. Lozeman, D.W. Litchfield, C. Piening, K. Takio, K.A. Walsh, E.G. Krebs, Isolation and characterization of human clones encoding the α and the α' subunits of casein kinase II, Biochemistry 29 (1990) pp. 8436-8447.
- [118] M. Lu, C. Miller, J.F. Habener, Functional regions of the homeodomain protein IDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene, Endocrinology 137 (1996) pp. 2959-2967.

- [119] W.M. Macfarlane, C.M. McKinnon, Z.A. Felton-Edkins, H. Cragg, R.F. James, K. Docherty, Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) pp. 1011-1016.
- [120] W.M. Macfarlane, M.L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, K. Docherty, Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner, *Biochem. J.* 303 (Pt 2) (1994) pp. 625-631.
- [121] W.M. Macfarlane, R.M. Shepherd, K.E. Cosgrove, R.F. James, M.J. Dunne, K. Docherty, Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca²⁺, *Diabetes* 49 (2000) pp. 418-423.
- [122] W.M. Macfarlane, S.B. Smith, R.F. James, A.D. Clifton, Y.N. Doza, P. Cohen, K. Docherty, The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) pp. 20936-20944.
- [123] O. Marin, F. Meggio, J.W. Perich, L.A. Pinna, Phosphotyrosine specifies the phosphorylation by protein kinase CK2 of a peptide reproducing the activation loop of the insulin receptor protein tyrosine kinase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) pp. 999-1005.
- [124] D.R. Marshak and D. Carroll, Synthetic peptide substrates for casein kinase II, *Methods Enzymol.* 200 (1991) pp. 134-156.
- [125] S. Marshak, E. Benshushan, M. Shoshkes, L. Havin, E. Cerasi, D. Melloul, Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) pp. 7583-7590.
- [126] S. Marshak, G. Leibowitz, F. Bertuzzi, C. Socci, N. Kaiser, D.J. Gross, E. Cerasi, D. Melloul, Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1230-1236.

- [127] S. Marshak, H. Totary, E. Cerasi, D. Melloul, Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (1996) pp. 15057-15062.
- [128] V. Martel, O. Filhol, A. Nueda, D. Gerber, M.J. Benitez, C. Cochet, Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells, *Mol. Cell. Biochem.* 227 (2001) pp. 81-90.
- [129] L.R. Martins, P. Lucio, A. Melao, I. Antunes, B.A. Cardoso, R. Stansfield, M.T. Bertilaccio, P. Ghia, D. Drygin, M.G. Silva, J.T. Barata, Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia* 28 (2013) pp. 179-182.
- [130] C. Martos, M. Plana, M.D. Guasch, E. Itarte, Effect of starvation, diabetes and insulin on the casein kinase 2 from rat liver cytosol, *Biochem. J.* 225 (1985) pp. 321-326.
- [131] H. Mashima, S. Yamada, T. Tajima, M. Seno, H. Yamada, J. Takeda, I. Kojima, Genes expressed during the differentiation of pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells, *Diabetes* 48 (1999) pp. 304-309.
- [132] T. Matsuoka, Y. Kajimoto, H. Watada, H. Kaneto, M. Kishimoto, Y. Umayahara, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, Y. Yamasaki, Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells, *J. Clin. Invest* 99 (1997) pp. 144-150.
- [133] L.J. McCulloch, M. van de Bunt, M. Braun, K.N. Frayn, A. Clark, A.L. Gloyn, GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus, *Mol. Genet. Metab* 104 (2011) pp. 648-653.
- [134] C.M. McKinnon and K. Docherty, Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function, *Diabetologia* 44 (2001) pp. 1203-1214.
- [135] F. Meggio and L.A. Pinna, One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?, *The FASEB Journal* 17 (2003) pp. 349-368.

- [136] D. Melloul, Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014 (2004) pp. 28-37.
- [137] D. Melloul, A. Tsur, D. Zangen, Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX-1) in health and disease, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 15 (2002) pp. 1461-1472.
- [138] R. Meng, Dissertation: "Crosstalk between Protein Kinase CK2 and the Transcription Factor Pdx-1", 2010.
- [139] R. Meng, F. Al-Quobaili, I. Müller, C. Götz, G. Thiel, M. Montenarh, CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity, *Cell Mol. Life Sci.* 67 (2010) pp. 2481-2489.
- [140] R. Meng, C. Götz, M. Montenarh, The role of protein kinase CK2 in the regulation of the insulin production of pancreatic islets, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401 (2010) pp. 203-206.
- [141] D.J. Michael, W. Xiong, X. Geng, P. Drain, R.H. Chow, Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion, *Diabetes* 56 (2007) pp. 1277-1288.
- [142] C.P. Miller, R.E. McGehee, Jr., J.F. Habener, IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene, *EMBO J.* 13 (1994) pp. 1145-1156.
- [143] S.P. Miller, G.R. Anand, E.J. Karschnia, G.I. Bell, D.C. LaPorte, A.J. Lange, Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype, *Diabetes* 48 (1999) pp. 1645-1651.
- [144] K. Minami, H. Yano, T. Miki, K. Nagashima, C.Z. Wang, H. Tanaka, J.I. Miyazaki, S. Seino, Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines, *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 279 (2000) p.E773-E781.
- [145] J.M. Moates, S. Nanda, M.A. Cissell, M.J. Tsai, R. Stein, BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells, *Diabetes* 52 (2003) pp. 403-408.

- [146] T. Moede, B. Leibiger, H.G. Pour, P. Berggren, I.B. Leibiger, Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1, *FEBS Lett.* 461 (1999) pp. 229-234.
- [147] M. Montenarh, Cellular regulators of protein kinase CK2, *Cell Tissue Res.* 342 (2010) pp. 139-146.
- [148] M. Montenarh, Protein kinase CK2 and angiogenesis, *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 23 (2014) pp. 153-158.
- [149] A.L. Mosley, J.A. Corbett, S. Ozcan, Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) pp. 2279-2290.
- [150] A.L. Mosley and S. Ozcan, Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) pp. 19660-19666.
- [151] A.L. Mosley and S. Ozcan, The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) pp. 54241-54247.
- [152] K. Mühlenfeld, Dissertation: "Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie HepG2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistaratte", 1999.
- [153] Y. Nagai, T. Kojima, Y. Muro, T. Hachiya, Y. Nishizawa, T. Wakabayashi, M. Hagiwara, Identification of a novel nuclear speckle-type protein, SPOP, *FEBS Lett.* 418 (1997) pp. 23-26.
- [154] N. Nakajima-Nagata, M. Sugai, T. Sakurai, J. Miyazaki, Y. Tabata, A. Shimizu, Pdx-1 enables insulin secretion by regulating synaptotagmin 1 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318 (2004) pp. 631-635.
- [155] F.J. Naya, C.M. Stellrecht, M.J. Tsai, Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor, *Genes Dev.* 9 (1995) pp. 1009-1019.
- [156] P.R. Njolstad, O. Sovik, A. Cuesta-Munoz, L. Bjorkhaug, O. Massa, F. Barbetti, D.E. Undlien, C. Shiota, M.A. Magnuson, A. Molven, F.M. Matschinsky, G.I. Bell,

8. Literaturverzeichnis

- Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) pp. 1588-1592.
- [157] H. Noguchi, H. Kaneto, G.C. Weir, S. Bonner-Weir, PDX-1 protein containing its own antenapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells, *Diabetes* 52 (2003) pp. 1732-1737.
- [158] M.F. Offield, T.L. Jetton, P.A. Labosky, M. Ray, R.W. Stein, M.A. Magnuson, B.L. Hogan, C.V. Wright, PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum, *Development* 122 (1996) pp. 983-995.
- [159] H. Ohlsson, K. Karlsson, T. Edlund, IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene, *EMBO J.* 12 (1993) pp. 4251-4259.
- [160] K. Ohneda, R.G. Mirmira, J. Wang, J.D. Johnson, M.S. German, The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) pp. 900-911.
- [161] L.K. Olson, J.B. Redmon, H.C. Towle, R.P. Robertson, Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein, *J. Clin. Invest* 92 (1993) pp. 514-519.
- [162] L.K. Olson, A. Sharma, M. Peshavaria, C.V. Wright, H.C. Towle, R.P. Robertson, R. Stein, Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92 (1995) pp. 9127-9131.
- [163] M.A. Pagano, J. Bain, Z. Kazimierczuk, S. Sarno, M. Ruzzene, G. Di Maira, M. Elliott, A. Orzeszko, G. Cozza, F. Meggio, L.A. Pinna, The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2. An update, *Biochem. J.* 415 (2008) pp. 353-365.
- [164] E. Papinutto, A. Ranchio, G. Lolli, L.A. Pinna, R. Battistutta, Structural and functional analysis of the flexible regions of the catalytic alpha-subunit of protein kinase CK2, *J. Struct. Biol.* 177 (2011) pp. 382-91.

- [165] B. Peers, S. Sharma, T. Johnson, M. Kamps, M. Montminy, The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain, *Mol. Cell Biol.* 15 (1995) pp. 7091-7097.
- [166] B. Perez-Villamil, P.T. Schwartz, M. Vallejo, The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development, *Endocrinology* 140 (1999) pp. 3857-3860.
- [167] R. Perfetti, J. Zhou, M.E. Doyle, J.M. Egan, Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats, *Endocrinology* 141 (2000) pp. 4600-4605.
- [168] S.J. Persaud, H. Asare-Anane, P.M. Jones, Insulin receptor activation inhibits insulin secretion from human islets of Langerhans, *FEBS Lett.* 510 (2002) pp. 225-228.
- [169] M. Peshavaria, E. Henderson, A. Sharma, C.V. Wright, R. Stein, Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) pp. 3987-3996.
- [170] H.V. Petersen, J.N. Jensen, R. Stein, P. Serup, Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization, *FEBS Lett.* 528 (2002) pp. 241-245.
- [171] H.V. Petersen, M. Peshavaria, A.A. Pedersen, J. Philippe, R. Stein, O.D. Madsen, P. Serup, Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor, *FEBS Lett.* 431 (1998) pp. 362-366.
- [172] H.V. Petersen, P. Serup, J. Leonard, B.K. Michelsen, O.D. Madsen, Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91 (1994) pp. 10465-10469.
- [173] F. Pierre, P.C. Chua, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M.K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J.P. Whitten, T.K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C.

8. Literaturverzeichnis

- Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W.G. Rice, D.M. Ryckman, Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer, *J. Med. Chem.* 54 (2011) pp. 635-654.
- [174] F. Pierre, P.C. Chua, S.E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M.K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J.P. Whitten, T.K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, W.G. Rice, D.M. Ryckman, K. Anderes, Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer, *Mol. Cell Biochem.* 356 (2011) pp. 37-43.
- [175] L.A. Pinna, Casein kinase 2: An 'eminence grise' in cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1054 (1990) pp. 267-284.
- [176] L.A. Pinna and F. Meggio, Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation, *Progress in Cell Cycle Research* 3 (1997) pp. 77-97.
- [177] A. Plotnikov, D. Chuderland, Y. Karamansha, O. Livnah, R. Seger, Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation, *Mol. Cell Biol.* 31 (2011) pp. 3515-3530.
- [178] V. Poitout and R.P. Robertson, Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity, *Endocrinology* 143 (2002) pp. 339-342.
- [179] M. Prentki, S. Vischer, M.C. Glennon, R. Regazzi, J.T. Deeney, B.E. Corkey, Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) pp. 5802-5810.
- [180] R. Puca, L. Nardinocchi, A. Sacchi, G. Rechavi, D. Givol, G. D'Orazi, HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription, *Mol. Cancer* 8 (2009) p.85.

- [181] F. Qaiser, J.H. Trembley, B.T. Kren, J.J. Wu, A.K. Naveed, K. Ahmed, Protein Kinase CK2 Inhibition Induces Cell Death Via Early Impact on Mitochondrial Function, *J. Cell Biochem.* (2014) [Epub ahead of print].
- [182] I. Rafiq, X. daSilva, S. Hooper, G.A. Rutter, Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 15977-15984.
- [183] A. Rethinaswamy, M.J. Birnbaum, C.V.C. Glover, Temperature-sensitive mutations of the CAK1 gene reveal a role for casein kinase II in maintenance of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) pp. 5869-5877.
- [184] R.P. Robertson, J. Harmon, P.O. Tran, Y. Tanaka, H. Takahashi, Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection, *Diabetes* 52 (2003) pp. 581-587.
- [185] M.G. Roper, W.J. Qian, B.B. Zhang, R.N. Kulkarni, C.R. Kahn, R.T. Kennedy, Effect of the insulin mimetic L-783,281 on intracellular Ca²⁺ and insulin secretion from pancreatic beta-cells, *Diabetes* 51 Suppl 1 (2002) p.S43-S49.
- [186] S. Sarno, E. Papinutto, C. Franchin, J. Bain, M. Elliott, F. Meggio, Z. Kazimierczuk, A. Orzeszko, G. Zanotti, R. Battistutta, L.A. Pinna, ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) pp. 1340-1351.
- [187] Y. Sayo, H. Hosokawa, H. Imachi, K. Murao, M. Sato, N.C. Wong, T. Ishida, J. Takahara, Transforming growth factor beta induction of insulin gene expression is mediated by pancreatic and duodenal homeobox gene-1 in rat insulinoma cells, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) pp. 971-978.
- [188] F.C. Schuit, P. Huypens, H. Heimberg, D.G. Pipeleers, Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus, *Diabetes* 50 (2001) pp. 1-11.
- [189] N. Schuster, C. Götz, M. Faust, E. Schneider, A. Prowald, A. Jungbluth, M. Montenarh, Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity, *J. Cell. Biochem.* 81 (2001) pp. 172-181.

- [190] P.T. Schwartz, B. Perez-Villamil, A. Rivera, R. Moratalla, M. Vallejo, Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) pp. 19106-19114.
- [191] V.M. Schwitzgebel, D.W. Scheel, J.R. Connors, J. Kalamaras, J.E. Lee, D.J. Anderson, L. Sussel, J.D. Johnson, M.S. German, Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas, *Development* 127 (2000) pp. 3533-3542.
- [192] S. Seinsoth, H. Uhlmann-Schiffler, H. Stahl, Bidirectional DNA unwinding by a ternary complex of T antigen, nucleolin and topoisomerase I, *EMBO Rep.* 4 (2003) pp. 263-268.
- [193] P. Serup, J. Jensen, F.G. Andersen, M.C. Jorgensen, N. Blume, J.J. Holst, O.D. Madsen, Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (1996) pp. 9015-9020.
- [194] P. Serup, H.V. Petersen, E.E. Pedersen, H. Edlund, J. Leonard, J.S. Petersen, L.I. Larsson, O.D. Madsen, The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site, *Biochem. J.* 310 (Pt 3) (1995) pp. 997-1003.
- [195] J. Seufert, G.C. Weir, J.F. Habener, Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus, *J. Clin. Invest* 101 (1998) pp. 2528-2539.
- [196] A. Sharma, L.K. Olson, R.P. Robertson, R. Stein, The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression, *Mol. Endocrinol.* 9 (1995) pp. 1127-1134.
- [197] D.Q. Shih and M. Stoffel, Molecular etiologies of MODY and other early-onset forms of diabetes, *Curr. Diab. Rep.* 2 (2002) pp. 125-134.

- [198] A. Siddiqui-Jain, D. Drygin, N. Streiner, P. Chua, F. Pierre, S.E. O'Brien, J. Bliesath, M. Omori, N. Huser, C. Ho, C. Proffitt, M.K. Schwaebe, D.M. Ryckman, W.G. Rice, K. Anderes, CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy, *Cancer Res.* 70 (2010) pp. 10288-10298.
- [199] J.K. Silva, J.K. Kaholokula, R. Ratner, M. Mau, Ethnic differences in perinatal outcome of gestational diabetes mellitus, *Diabetes Care* 29 (2006) pp. 2058-2063.
- [200] J.W. Slaton, G.M. Unger, D.T. Sloper, A.T. Davis, K. Ahmed, Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model, *Cell Growth Differ.* 2 (2004) pp. 712-721.
- [201] L. Solyakov, K. Cain, B.M. Tracey, R. Jukes, A.M. Riley, B.V.L. Potter, A.B. Tobin, Regulation of casein kinase-2 (CK2) activity by inositol phosphates, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) pp. 43403-43410.
- [202] J. Sommercorn, J.A. Mulligan, F.J. Lozeman, E. Krebs, Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) pp. 8834-8838.
- [203] Y.H. Son, S.H. Moon, J. Kim, The protein kinase 2 inhibitor CX-4945 regulates osteoclast and osteoblast differentiation In vitro, *Mol. Cells* 36 (2013) pp. 417-423.
- [204] S.K. Sreenan, B.N. Cockburn, A.C. Baldwin, D.M. Ostrega, M. Levisetti, A. Grupe, G.I. Bell, T.A. Stewart, M.W. Roe, K.S. Polonsky, Adaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice, *Diabetes* 47 (1998) pp. 1881-1888.
- [205] G. Stalter, S. Siemer, E. Becht, M. Ziegler, K. Remberger, O.-G. Issinger, Asymmetric expression of protein kinase CK2 in human kidney tumors., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) pp. 141-147.
- [206] V. Stanojevic, J.F. Habener, M.K. Thomas, Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300, *Endocrinology* 145 (2004) pp. 2918-2928.

- [207] D.A. Stoffers, T.J. Kieffer, M.A. Hussain, D.J. Drucker, S. Bonner-Weir, J.F. Habener, J.M. Egan, Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas, *Diabetes* 49 (2000) pp. 741-748.
- [208] D.A. Stoffers, M.K. Thomas, J.F. Habener, Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression, *Trends Endocrinol. Metab* 8 (1997) pp. 145-151.
- [209] D.A. Stoffers, N.T. Zinkin, V. Stanojevic, W.L. Clarke, J.F. Habener, Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence, *Nat. Genet.* 15 (1997) pp. 106-110.
- [210] Y. Tanaka, C.E. Gleason, P.O. Tran, J.S. Harmon, R.P. Robertson, Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96 (1999) pp. 10857-10862.
- [211] M.J. Tanasijevic, M.G. Myers, Jr., R.S. Thoma, D.L. Crimmins, M.F. White, D.B. Sacks, Phosphorylation of the insulin receptor substrate IRS-1 by casein kinase II, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) pp. 18157-18166.
- [212] D.Q. Tang, L.Z. Cao, B.R. Burkhardt, C.Q. Xia, S.A. Litherland, M.A. Atkinson, L.J. Yang, In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow, *Diabetes* 53 (2004) pp. 1721-1732.
- [213] S. Tawfic, A.T. Davis, R.A. Faust, M. Gapany, K. Ahmed, Association of protein kinase CK2 with nuclear matrix: Influence of method of preparation of nuclear matrix, *J. Cell. Biochem.* 64 (1997) pp. 499-504.
- [214] N. Theis-Febvre, V. Martel, B. Laudet, C. Souchier, D. Grunwald, C. Cochet, O. Filhol, Highlighting protein kinase CK2 movement in living cells, *Mol. Cell Biochem.* 274 (2005) pp. 15-22.
- [215] Thermo Scientific, 2014.
- [216] M.K. Thomas, K.M. Yao, M.S. Tenser, G.G. Wong, J.F. Habener, Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) pp. 8492-8504.

- [217] E. Valero, S. De Bonis, O. Filhol, R.H. Wade, J. Langowski, E.M. Chambaz, C. Cochet, Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) pp. 8345-8352.
- [218] R.H. Voss, C. Lotz, A. Cellary, M. Theobald, Targeting p53, hdm2, and CD19: vaccination and immunologic strategies, *Bone Marrow Transplant.* 25 (2000) p.S43-S45.
- [219] G. Waeber, N. Thompson, P. Nicod, C. Bonny, Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) pp. 1327-1334.
- [220] A.Y. Wang, A. Ehrhardt, H. Xu, M.A. Kay, Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver, *Mol. Ther.* 15 (2007) pp. 255-263.
- [221] G. Wang, G. Unger, K.A. Ahmad, J.W. Slaton, K. Ahmed, Downregulation of CK2 induces apoptosis in cancer cells--a potential approach to cancer therapy, *Mol. Cell Biochem.* 274 (2005) pp. 77-84.
- [222] X. Wang, C.M. Cahill, M.A. Pineyro, J. Zhou, M.E. Doyle, J.M. Egan, Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells, *Endocrinology* 140 (1999) pp. 4904-4907.
- [223] H. Watada, Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, Y. Yamasaki, The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells, *Diabetes* 45 (1996) pp. 1478-1488.
- [224] S.M. Watt, J.A. Thomas, S.J. Murdoch, L. Kearney, S.E. Chang, J. Bartek, Human thymic epithelial cells are frequently transformed by retroviral vectors encoding simian virus 40, *Cell. Immunol.* 138 (1991) pp. 456-472.
- [225] S. Welker, Diplomarbeit: "Wechselwirkung Zwischen Der Proteinkinase CK2 Und Dem Transkriptionsfaktor PDX-1 - Neue Ansätze zur Regulation des Insulinmetabolismus und der Glucosehomöostase", 2011.

- [226] S. Welker, C. Götz, C. Servas, M.W. Laschke, M.D. Menger, M. Montenarh, Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic β -cells and its interaction with PDX-1., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) pp. 2786-2795.
- [227] N. Wilhelm, K. Kostelnik, C. Götz, M. Montenarh, Protein Kinase CK2 Is Implicated in Early Steps of the Differentiation of Preadipocytes into Adipocytes, 2012, pp. 37-45.
- [228] K.C. Wilson, W.W. Cruikshank, D.M. Center, Y. Zhang, Prointerleukin-16 Contains a Functional CcN Motif that Regulates Nuclear Localization, *Biochemistry* 41 (2002) pp. 14306-14312.
- [229] H. Wu, W.M. Macfarlane, M. Tadayyon, J.R. Arch, R.F. James, K. Docherty, Insulin stimulates pancreatic-duodenal homoeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells, *Biochem. J.* 344 Pt 3 (1999) pp. 813-818.
- [230] C.P. Xavier, R.H. Rastetter, M. Blomacher, M. Stumpf, M. Himmel, R.O. Morgan, M.P. Fernandez, C. Wang, A. Osman, Y. Miyata, R.A. Gjerset, L. Eichinger, A. Hofmann, S. Linder, A.A. Noegel, C.S. Clemen, Phosphorylation of CRN2 by CK2 regulates F-actin and Arp2/3 interaction and inhibits cell migration, *Sci. Rep.* 2 (2012) p.241.
- [231] X. Xu, P.A. Toselli, L.D. Russell, D.C. Seldin, Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II α' catalytic subunit, *Nature Genet.* 23 (1999) pp. 118-121.
- [232] S. Yoshida, Y. Kajimoto, T. Yasuda, H. Watada, Y. Fujitani, H. Kosaka, T. Gotow, T. Miyatsuka, Y. Umayahara, Y. Yamasaki, M. Hori, PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells, *Diabetes* 51 (2002) pp. 2505-2513.
- [233] D.H. Zangen, S. Bonner-Weir, C.H. Lee, J.B. Latimer, C.P. Miller, J.F. Habener, G.C. Weir, Reduced insulin, GLUT2, and IDX-1 in beta-cells after partial pancreatectomy, *Diabetes* 46 (1997) pp. 258-264.
- [234] W.S. Zawalich, G.J. Tesz, K.C. Zawalich, Are 5-hydroxytryptamine-preloaded beta-cells an appropriate physiologic model system for establishing that insulin stimulates insulin secretion?, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) pp. 37120-37123.

8. Literaturverzeichnis

- [235] W.S. Zawalich and K.C. Zawalich, Effects of glucose, exogenous insulin, and carbachol on C-peptide and insulin secretion from isolated perfused rat islets, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) pp. 26233-26237.
- [236] S. Zhang and K.H. Kim, Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene, *Arch. Biochem. Biophys.* 338 (1997) pp. 227-232.

9. Publikationen

Feng D, **Welker S**, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW. Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis*. 2012 Jun; 15(2):243-52. Epub 2012 Feb 22.

Ampofo E, **Welker S**, Jung M, Müller L, Greiner M, Zimmermann R, Montenarh M. CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62. *Biochem Biophys Acta*. 2013 Apr; 1830(4):2938-45. Epub 2012 Dec 31.

Welker S, Götz C, Servas C, Laschke MW, Menger MD, Montenarh M. Glucose regulates protein kinase CK2 in pancreatic β -cells and its interaction with PDX-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Dec;45(12):2786-95. Epub 2013 Oct 12.

Welker S, Servas C, Meng R, Götz C, Montenarh M. Tissue specific functions and regulation of protein kinase CK2. *Protein kinase CK2 cellular functions in normal and disease states*. eds Ahmed, K., Issinger, O.G. und Szyszka, R. Springer, im Druck

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Montenarh für die freundliche Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie der Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Durch viele anregende Diskussionen hat er maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen und mir geholfen mein wissenschaftliches Denken zu fördern. Er hat meine Arbeit jederzeit professionell und warmherzig begleitet und mich auch in menschlicher Hinsicht immer unterstützt. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Grässer bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Zweitberichterstattung meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch Frau Prof. Dr. C. Götz, die durch das Einbringen von vielen guten Ideen meine Arbeit stets vorangebracht hat und immer ein offenes Ohr bei der Umsetzung vieler Experimente für mich hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Janine Becker, Dr. M. W. Laschke und Prof. Dr. M. D. Menger vom Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg für das Kooperationsinteresse an meinem Projekt bedanken. Die Experimente am primären Mausmodell tragen entscheidend zu meiner Arbeit bei.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. K. Rother aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg bedanke ich mich für die Hilfestellung bei den qRT-*Real time*-PCR Analysen.

Ein aufrichtiger Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die allgegenwärtigen Hilfsbereitschaft. Vor allem bei Frau S. Kartarius bedanke ich mich für die Hilfestellung und Geduld bei der experimentellen Einarbeitung.

Meinen Kollegen Sarah Lupp, Catalina Sawatzki und Emmanuel Ampofo danke ich für ihre Freundschaft und die vielen humorvollen Momente, die wir in den letzten Jahren verbracht haben. Vor allem Sarah Lupp danke ich darüber hinaus für die tatkräftige experimentelle Hilfestellung in den letzten Monaten meiner Arbeit.

Nicht zuletzt gilt ein besonderes Dankeschön meiner Familie und meinem Mann, die mich jederzeit unterstützten und mit viel Verständnis und ihrem Glauben an mich durch Studium und Promotion begleitet haben.

Lebenslauf

Name: Sabrina Klein, geborene Welker
Adresse: Landstuhler Straße 34
66482 Zweibrücken
Geburtsdatum: 01.09.1986
Geburtsort: Neunkirchen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1993 - 07/1997 Grundschule Kohlhof, Neunkirchen
09/1997 - 06/2006 Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2006 - 08/2011 Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt
Human- und Molekularbiologie an der
Universität des Saarlandes
Abschluss als Diplom-Biologin

02/2010 - 05/2010 **Fortgeschrittenen Praktikum**
Thema: *"Bedeutung der Phosphorylierung des Androgen-
rezeptors an Serin 650 für seine Funktionalität"*
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Montenarh
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes

11/2010 - 08/2011 **Diplomarbeit**
Thema: *"Wechselwirkung zwischen der Proteinkinase CK2
und dem Transkriptionsfaktor PDX-1 - Neue Ansätze zur
Regulation des Insulinmetabolismus und der Glucose-
homöostase"*
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Montenarh
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes

Beruflicher Werdegang

09/2011 - 09/2014

Promotion

Thema: *"Die Interaktion von PDX-1 und CK2 unter dem Einfluss von Glucose in den β -Zellen des Pankreas"*

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Montenarh

Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Universität des Saarlandes