

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Pharmakologie für Pharmazeuten
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Die Rolle der Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK) für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Jorge Enrique Duque Escobar

Hamburg, April 2017

Januar 2013 - April 2017

Datum der Disputation: 09. Juni 2017

Datum der Zulassung zur Veröffentlichung: 10. Juli 2017

- 1. Gutachterin:** Prof. Dr. med. Elke Oetjen
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Viacheslav Nikolaev

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Das Pankreas und seine Funktion.....	1
1.1.2 Definition und Prävalenz des Diabetes mellitus.....	2
1.1.3 Diagnose, Klassifikation und Therapie des Diabetes mellitus.....	3
1.2 Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK).....	6
1.2.1 DLK-Signalweg.....	8
1.3 Der Transkriptionsfaktor CREB (<i>cAMP response element binding protein</i>).....	10
1.4 Calcineurin.....	10
1.5 Rolle der DLK und Calcineurin zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ2...	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Geräte.....	25
2.1.3 Software.....	29

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.5 Kits.....	32
2.1.6 Antikörper.....	33
2.1.7 Plasmide.....	34
2.1.7.1 Expressionsplasmide.....	34
2.1.7.2 Reporterplasmide.....	36
2.1.8 DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker.....	36
2.1.9 Biologisches Material.....	37
2.1.9.1 Bakterienstämme.....	37
2.1.9.1.a Medien.....	37
2.1.9.1.b Herstellung chemisch kompetenter <i>E. Coli</i>	38
2.1.9.2 Zelllinien.....	38
2.1.9.2.a Puffer.....	38
2.1.9.2.b HIT-T15 Zellen.....	39
2.1.9.2.b.I Medien, Kultur und Langzeitkonservierung.....	39
2.1.9.2.c JEG-3 Zellen.....	40
2.1.9.2.c.I Medien, Kultur und Langzeitkonservierung.....	40
2.1.9.3 Tiermodell.....	41
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 DNA orientierte Experimente.....	41
2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.2.1.2 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen.....	42
2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit.....	43
2.2.1.3.a Photometrische Bestimmung.....	43

2.2.1.3.b Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarosegel.....	44
2.2.1.4 Restriktionsenzymverdau.....	45
2.2.1.5 DNA-Dephosphorylierung des 5'-Endes.....	47
2.2.1.6 DNA-Ligation.....	48
2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
2.2.1.7.a Klonierung der pcDNA3.1-DLK-Mutanten.....	49
2.2.1.7.b Generierung der pMAL-MBP-TEV-DLK-Konstrukte.....	54
2.2.1.7.c Bestimmung des Mausgenotyps bei der Generierung der β -zellspezifisch defizienten Mäuse (β -DLK ^{-/-}).....	56
2.2.1.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	57
2.2.1.9 DNA-Minipräparation.....	58
2.2.1.10 DNA-Maxipräparation.....	59
2.2.1.11 DNA-Sequenzierung.....	60
2.2.2 Protein orientierte Experimente.....	60
2.2.2.1 Zellyse zur Proteinanalyse.....	60
2.2.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes.....	61
2.2.2.2.a Bestimmung mittels Bradford Protein Assay.....	61
2.2.2.2.b Semi-quantitative Bestimmung mittels SDS-PAGE.....	62
2.2.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). 63	
2.2.2.4 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung (Coomassie Färbung).....	65
2.2.2.5 Immunoblot (Western Blot).....	66
2.2.2.6 Protein-Aufreinigung.....	68

2.2.2.6.a <i>His₆-tagged Fusionssysteme</i>	68
2.2.2.6.a.I <i>Screening</i>	70
2.2.2.6.a.II <i>Protein-Aufreinigung</i>	71
2.2.2.6.b <i>MBP-tagged Fusionssysteme</i>	73
2.2.2.7 Protein-Protein Interaktionsassay.....	76
2.2.2.8 Kompetition-Assay mit Oligopeptiden.....	79
2.2.3 Arbeiten mit HIT-T15 und JEG-3 Zellen.....	80
2.2.3.1 Transiente Transfektionen.....	80
2.2.3.2 Immuncytochemie.....	81
2.2.3.3 Luciferase-Reportergen-Assay.....	84
2.2.3.3.a <i>Behandlung und Ernte der Zellextrakte</i>	86
2.2.3.3.b <i>Messung der Luciferase-Reportergen-Aktivität</i>	86
2.2.3.3.c <i>Messung der GFP-Reportergen-Aktivität</i>	86
2.2.4 Herstellung transgener Mäuse.....	87
2.2.4.1 Generierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse (β -DLK ^{-/-})....	87
2.2.4.1.a <i>Herstellung transgener chimären Mäuse mit dem targeting-Vektor für DLK</i>	87
2.2.4.1.b <i>Verpaarungsschemata der Mäuse zur Generierung von β-zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β-DLK^{-/-})</i>	90
2.2.4.2 Glukoseinduzierte Insulinsekretion.....	98
2.2.4.3 Isolierung Langerhans'scher Inseln.....	99
2.2.4.4 Kultivierung isolierter Langerhans'schen Inseln.....	101
2.2.4.5 Immunhistologische Analyse.....	102

2.2.4.5.a Immunhistologische Untersuchung mittels einer 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung an Paraffinschnitten.....	103
2.2.4.5.b Immunhistologische Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Färbung an Pankreas-Kryoschnitten.....	105
2.2.4.5.c Immunhistologische Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Färbung an isolierten Langerhans'schen Inseln.....	106
2.2.5 Statistik.....	106
3 Ergebnisse.....	107
3.1 Subzelluläre Lokalisation der DLK.....	107
3.1.1 Charakterisierung eines funktionellen <i>Nuclear Export Signal</i> (NES) innerhalb der DLK.....	107
3.1.1.1 DLK NES Proteinexpression und enzymatische Aktivität.....	107
3.1.1.2 DLK NES und stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription..	108
3.1.1.3 DLK NES, nukleäre Lokalisation und β -Zellapoptose.....	110
3.1.2 Kontrollen der stimulusinduzierten nukleären Translokation der DLK.....	114
3.1.2.1 Kontrolle der stimulusinduzierte subzellulären Lokalisation der DLK mit einem cytoplasmatischen Protein.....	114
3.1.2.2 Kontrolle der stimulusinduzierten nukleären Translokation der überexprimierten DLK in Abwesenheit endogener DLK.....	116
3.1.3 Zusammenfassung.....	118
3.2 Regulation der DLK durch Calcineurin.....	119
3.2.1 Phosphorylierung von endogenen DLK und JNK nach Behandlung mit Calcineurininhibitoren.....	119
3.2.2 Identifizierung von zwei Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK.....	121

3.2.3 Die LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne.....	122
3.2.3.1 DLK Mutanten der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne.....	123
3.2.3.1.a <i>Proteinexpression und enzymatische Aktivität</i>	123
3.2.3.1.b <i>Protein-Protein Interaktion</i>	124
3.2.3.1.c <i>Kompetition-Assay mit Oligopeptiden</i>	125
3.2.3.1.d <i>Stimulusinduzierte CRE/CREB-abhängige Gentranskription</i>	126
3.2.3.2 Die calcineurinbindungsdefiziente DLK V364A Mutante.....	129
3.2.3.2.a <i>DLK V364A, subzelluläre Lokalisation und β-Zellapoptose</i>	130
3.2.3.2.b <i>DLK V364A und die CRE-abhängige Gentranskription nach Behandlung mit den spezifischen Calcineurininhibitoren CsA und FK506</i>	133
3.2.3.3 JNK-Signalweg.....	135
3.2.3.3.a <i>c-Jun Phosphorylierung und c-Jun-abhängige Gentranskription</i> ...	136
3.2.3.3.b <i>c-fos-abhängige Gentranskription</i>	137
3.2.3.4 Beitrag der DLK L362A Mutante zur Stabilität der Kinase.....	140
3.2.4 Zusammenfassung.....	145
3.3 Charakterisierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β -DLK ^{-/-})..	146
3.3.1 Phänotypische Unterschiede.....	146
3.3.2 Abwesenheit der DLK in den primären Langerhans'schen Inseln der β -DLK ^{-/-} Mäuse.....	146
3.3.3 Anwesenheit der DLK in verschiedenen Gehirnregionen der β -DLK ^{-/-} Mäuse.....	150

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.4 Glukoseinduzierte Insulinsekretion.....	151
4 Diskussion.....	153
4.1 β -zellspezifisch DLK defiziente Mäuse (β -DLK ^{-/-}).....	153
4.2 Regulation der DLK.....	159
4.2.1 Regulation der DLK durch Calcineurin.....	159
4.2.2 Subzelluläre Lokalisation der DLK.....	168
5 Zusammenfassung.....	171
6 Abstract.....	173
7 Literaturverzeichnis.....	175
8 Anhang.....	188
Lebenslauf.....	188
Kongressteilnahme.....	189
Publikationsliste.....	190
Weitere wissenschaftliche Leistungen.....	191
Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS (H- und P-Sätze).....	192
9 Danksagung.....	198
10 Eidesstattliche Versicherung.....	200

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AID	Autoinhibitorische Domäne
AMP	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Einweg-Analyse der Varianz
ApoE	Humanes Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BBD	CNB-bindende Domäne
bp	Basenpaare
BS	Bluescript
BSA	Bovines Serum Albumin (Albumin Fraktion V)
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin-bindende Domäne
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB bindendes Protein
c-fos	FBJ murine osteosarkoma viral oncogene
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
c-jun	Jun Oncogene
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CN	Calcineurin
CNA	Calcineurin katalytische Untereinheit A
CNB	Calcineurin regulatorische Untereinheit B
Cre	<i>cyclization recombinase</i>
CRE	cAMP responsives Element
CREB	cAMP responsives Element Bindendes Protein
CRIB	Cdc2/Rac-interaktive Bindung
CRTC	<i>cAMP regulated transcriptional coactivator 1</i>
CsA	Ciclosporin
Cyp	Cyclophilin
C-terminal	Carboxy-terminal
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4'()-Diamidino-2-phenylindol
DDP-IV	Dipeptidylpeptidase-4
dH ₂ O	Demineralisiertes, autoklaviertes Wasser
dL	Deciliter
DLK	Dual Leucine-Zipper Kinase
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
Draq5	Draq5 (1,5-bis[[2-(di-methylamino)ethyl]amino]-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione, Cell Signaling

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N',N'-tetraessigsäure
EPAC	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
Et al.,	<i>Et alii (and others)</i>
EtBr	<i>Ethidiumbromid</i>
FK506	Tacrolimus
FKBP12	<i>FK506 binding protein</i>
Flp	Flippase
g	gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFPtpz	Grün fluoreszierendes Protein <i>topaz gold</i>
GLOB	Global
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
Hb1Ac	Glykohämoglobin-Wert
His ₆	Hexahistidin
HIT	Hamster Insulinoma Tumor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IB1	<i>Islet-Brain1</i>
IDF	International Diabetes Federation
IDDM	<i>insulin-dependent DM</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP	Immunophilin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRS-1	Insulin Receptor Substrat-1
IS	Immunsuppressiva
JEG	Mensch Chorion-Karzinom-Tumor
JIP	<i>JNK-interacting protein</i>
JNK	C-jun N-terminale kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID	<i>Kinase inducible domain</i>
KO	<i>Knock out</i>
L	Liter
LADA	<i>late onset autoimmunity diabetes in the adult</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LZ	Leucine-Zipper
LZK	Leucine-Zipper Kinase
LoxP	Erkennungssequenz für die <i>cyclization recombinase</i>
Luc	Luciferase-Reportergen
m	Meter
MafA/B	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A/B</i>
MAP	Mitogen-aktivierte Protein kinase
MAP2K	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MEKK1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 1
M	Molare Konzentration (mol/L)
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
min	Minuten
MKK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase
MLK	Mixed Lineage Kinase
µmol	Mikromol
mmol	Millimol
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the young</i>
MUK	<i>Mitogen-activated protein kinase upstream kinase</i>
ng	Nano Gramm
NES	<i>Nuclear export signal</i> (Nukleäres Exportsignal)
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NIDDM	<i>non-insulin-dependent DM</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> (Kernerkennungssequenz)
NPG	Nüchtern-Plasmaglukose
NPH	Neutral-Protamin Hagedorn
OD	Optische Dichte
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii (pH-Wert)
P-JNK	Phosphoryliertes JNK
PKA	Proteinkinase A
PP	Proteinphosphatase
PTDM	Posttransplantationsdiabetes mellitus
RIP	Ratteninsulin-2-Promotors
RLU	Relative Lichteinheiten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SH3	<i>SRC homology 3</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>SOB with catabolite repression</i>
SV-40	Siminian-Virus 40
T	Tween
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TORC	Transducer of Regulated CREB
U	Umdrehungen pro Minute
X	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volumen
vs.	<i>versus</i>
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	Wildtyp
x	Vielfaches
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
ZPK	Leucine Zipper Protein Kinase

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin (Ala)	C	Cystein (Cys)
D	Aspartat (Asp)	E	Glutamat (Glu)
F	Phenylalanin (Phe)	G	Glycin (Gly)
H	Histidin (His)	I	Isoleucin (Iso)
K	Lysin (Lys)	L	Leucin (Leu)
M	Methionin (Met)	N	Asparagin (Asn)
P	Prolin (Pro)	Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)	S	Serin (Ser)
T	Threonin (Thr)	V	Valin (Val)
W	Tryptophan (Trp)	Y	Tyrosin (Tyr)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schätzungen von Menschen mit Diabetes mellitus weltweit und pro Region. (Seite 3)

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Primärstruktur der murinen DLK. (Seite 7)

Abbildung 1.3: DLK-Signalkaskade. (Seite 9)

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Primärstruktur und Domänenstruktur von Calcineurin A (katalytische Untereinheit A). (Seite 11)

Abbildung 1.5: Verminderung der β -Zellmasse und β -Zellfunktion durch DLK führt zu Diabetes mellitus. (Seite 14)

Abbildung 1.6: DLK und Calcineurin in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. (Seite 15)

Abbildung 2.1: Kalibrierung der Absorption / c (DNA) [y,x]. (Seite 44)

Abbildung 2.2: Repräsentative Darstellung zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen aus einem Agarosegel mithilfe eines DNA-Größenmarkers. (Seite 45)

Abbildung 2.3: Schema zur Herstellung der pcDNA3.1-DLK-Mutanten mittels *site-directed mutagenesis*. (Seite 50)

Abbildung 2.4: Schema des pcDNA3.1-DLK wt mit den Calcineurin-Interaktionsdomänen und Restriktionsenzymen zur Herstellung der DLK CND. (Seite 51)

Abbildung 2.5: Schema der pMAL-c2x MBP-DLK wt (links) und pMAL-c2x MBP-TEV-DLK wt (rechts) Plasmide. (Seite 55)

Abbildung 2.6: Exemplarische Aufnahme einer semi-quantitativen SDS-PAGE. (Seite 62)

Abbildung 2.7: Repräsentative Darstellung der für den Transfer verwendeten Anordnung in der Transferkammer (nasser Transfer). (Seite 67)

Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Protein-Aufreinigung vom His₆-Calcineurin mittels Affinitätschromatographie. (Seite 72)

Abbildung 2.9: Exemplarische Aufnahme der bei der Protein-Aufreinigung gesammelten Fraktionen inklusive Kontrollen. (Seite 73)

Abbildung 2.10: Exemplarische Aufnahme der beim Screening selektionierten Kolonien. (Seite 74)

Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Proteinreinigung von MBP-TEV-DLK₁₄₀₋₅₁₇ Proteine mittels Affinitätschromatographie. (Seite 74)

Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Protein-Protein Interaktion (Seite 76)

Abbildung 2.13: Fließschema zur Protein-Protein Interaktion. (Seite 78)

Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des *targeting* Knock-out Vektors für DLK. (Seite 87)

Abbildung 2.15: Das Verfahren zur Herstellung von Knock-out Mäusen. (Seite 89)

Abbildung 2.16: Chimäre transgene Mäuse. (Seite 89)

Abbildung 2.17: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt I. (Seite 90)

Abbildung 2.18: Schematische Darstellung, Genotypisierung I. (Seite 90)

Abbildung 2.19: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt II. (Seite 91)

Abbildung 2.20: Schematische Darstellung, Deletion der Neomycin Selektionskassette und Genotypisierung II. (Seite 91)

Abbildung 2.21: Konstitutive Expression der bakteriellen β -Galactosidase Aktivität in Langerhans'schen Inseln der LacZ⁺ Mäusen. (Seite 92)

Abbildung 2.22: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt III. (Seite 93)

Abbildung 2.23: Schematische Darstellung, Deletion der Exone 3 - 6 des DLK-Gens in einem Allel und Genotypisierung III. (Seite 94)

Abbildung 2.24: Schematische Darstellung, Generierung DLK^{fl/fl} (flox/flox) Mäuse. (Seite 94)

Abbildung 2.25: Nachweis auf Hetero- und Homozygotie mittels PCR. (Seite 95)

Abbildung 2.26: Schematische Darstellung, Generierung der konditionalen homozygoten β -zellspezifisch oder globalen DLK defizienten Mäuse (β -DLK^{-/-} oder DLK^{-/-}) sowie der homozygoten DLK^{fl/fl} (flox/flox) Mäuse. (Seite 96)

Abbildung 2.27: Schematische Darstellung, Deletion der Exone 3 - 6 des DLK-Gens in beiden Allelen (konditionaler DLK-KO Maus). (Seite 96)

Abbildung 2.28: Nachweis auf Hetero- und Homozygotie bei den DLK defizienten Mäusen mittels PCR. (Seite 97)

Abbildung 2.29: Bestimmung des Genotyps des letzten Verpaarungsschrittes der generierten DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-} oder DLK^{-/-}). (Seite 98)

Abbildung 2.30: Verfahren der Ductus-Injektion und Pankreas-Entfernung. (Seite 99)

Abbildung 2.31: Pankreas vor und nach Ductus-Injektion. (Seite 100)

Abbildung 2.32: Verlust der Inselmorphologie ab Tag 7 nach Isolation. (Seite 101)

Abbildung 3.1: Expression von DLK NES und Vergleich der jeweiligen Phosphorylierung von JNK. (Seite 108)

Abbildung 3.2: Kein Unterschied zwischen DLK wt und DLK NES in Bezug auf die mit TNF α - und KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription. (Seite 109)

Abbildung 3.3: Exemplarische immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der transient transfizierten HIT Zellen. (Seite 111)

Abbildung 3.4: Auswirkung der DLK NES Mutante auf die nukleäre Lokalisation. (Seite 112)

Abbildung 3.5: Auswirkung der DLK NES Mutante auf die β -Zellapoptose. (Seite 113)

Abbildung 3.6: Cytoplasmatische Lokalisation des cAMP-Sensors mit und ohne TNF α -Behandlung (Lebendfärbung). (Seite 115)

Abbildung 3.7: Koloalisation des cAMP-Sensors mit überexprimiertem DLK wt. (Seite 116)

Abbildung 3.8: Identifizierung einer Zelllinie ohne endogene Expression von DLK. (Seite 117)

Abbildung 3.9: Subzelluläre Lokalisation der DLK in JEG-3 Zellen. (Seite 117)

Abbildung 3.10: Quantitative Auswertung der nukleären DLK-Lokalisation in JEG-3 Zellen. (Seite 118)

Abbildung 3.11: Phosphorylierungen von endogenen DLK und JNK nach Behandlung mit TNF α und den Calcineurininhibitoren. (Seite 120)

Abbildung 3.12: Vergleich der Phosphorylierung von DLK und JNK durch DLK wt und DLK Mutanten der Calcineurin-Interaktionsdomäne. (Seite 122)

Abbildung 3.13: Die putativen Calcineurin-Interaktionsdomänen in der Röntgenkristallstruktur von DLK (Patel et al., 2015). (Seite 123)

Abbildung 3.14: Vergleich der Phosphorylierung von DLK und JNK durch DLK wt und DLK Mutanten der zweiten Calcineurin-Interaktionsdomäne (LxVP). (Seite 124)

Abbildung 3.15: Rekombinantes MBP-DLK V364A Protein interagiert nicht mit rekombinant hergestelltem Calcineurin. (Seite 125)

Abbildung 3.16: Aufhebung der DLK-Calcineurin Interaktion mittels eines LxVP-Peptides. (Seite 126)

Abbildung 3.17: DLK V364A Mutante hemmte die stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription. (Seite 127)

Abbildung 3.18: DLK V364A Mutante zeigte eine stärkere Hemmung der CRE- und CREB-abhängigen Gentranskription. (Seite 128)

Abbildung 3.19: DLK V364A Mutante zeigte dosisabhängig eine stärkere Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription als DLK wt. (Seite 129)

Abbildung 3.20: Exemplarische immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der mit DLK wt und DLK V364A transient transfizierten HIT Zellen. (Seite 131)

Abbildung 3.21: Auswirkung der calcineurinbindungsdefizienten DLK V364A Mutante auf die nukleäre Lokalisation und auf die β -Zellapoptose. (Seite 132)

Abbildung 3.22: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Calcineurininhibitoren CsA und Tacrolimus in HIT Zellen. (Seite 134)

Abbildung 3.23: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Calcineurininhibitoren CsA und Tacrolimus in JEG Zellen. (Seite 135)

Abbildung 3.24: Die DLK Mutanten der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne zeigten keine Unterschiede in Bezug auf die Phosphorylierung von c-Jun und auf die c-Jun-abhängige Gentranskription verglichen mit DLK wt. (Seite 137)

Abbildung 3.25: Schematische Darstellung des c-fos Genpromotors. (Seite 138)

Abbildung 3.26: Transkriptionelle Aktivität des c-fos Genpromotors. (Seite 139)

Abbildung 3.27: Stimulierte transkriptionelle Aktivität des c-fos Genpromotors. (Seite 140)

Abbildung 3.28: Die „Sandwich“-Struktur in der Röntgenkristallstruktur von DLK. (Seite 141)

Abbildung 3.29: Vergleich der Phosphorylierung von DLK am Ser-302 durch DLK wt und DLK Mutanten (L362R, W334A, Y343A, Y343F). (Seite 142)

Abbildung 3.30: Vergleich der Phosphorylierung von JNK durch DLK wt und DLK Mutanten (L362R, W334A, Y343A, Y343F). (Seite 143)

Abbildung 3.31: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch DLK Mutanten der „Sandwich“-Struktur. (Seite 144)

Abbildung 3.32: Keine Unterschiede im Körpergewicht von 14 - 15 alten β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. (Seite 146)

Abbildung 3.33: Abwesenheit der DLK in Langerhans'schen Inseln der β -DLK^{-/-} Mäusen. (Seite 147)

Abbildung 3.34: Schwache DLK-Protein-Expression in den isolierten Langerhans'schen Inseln der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse. (Seite 148)

Abbildung 3.35: DLK-Expression und Lokalisation der α - und β -Zellen in Langerhans'schen Inseln von β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. (Seite 149)

Abbildung 3.36: DLK-Proteinexpression in den α -Zellen der isolierten Langerhans'schen Inseln der β -DLK^{-/-} Mäuse. (Seite 150)

Abbildung 3.37: Anwesenheit der DLK in verschiedenen Gehirnregionen der β -DLK^{-/-} Mäuse. (Seite 151)

Abbildung 3.38: Glukoseinduzierte Insulinsekretion der isolierten Langerhans'schen Inseln von β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. (Seite 152)

Abbildung 4.1: β -zellspezifische Tiermodelle. (Seite 154)

Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Verdrängungsreaktion des überexprimierten DLK wt von Calcineurin durch die Immunsuppressiva CsA und FK506. (Seite 163)

Abbildung 4.3: Kompetitive Hemmung von Calcineurin durch CsA, FK506 und LxVP-Substrate. (Seite 164)

Abbildung 4.4: Stärkere Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die calcineurinbindungsdefiziente Mutante. (Seite 165)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Primer der pcDNA3.1-DLK-Mutanten (Seite 52)

Tabelle 2.2: PCR-Protokolle der pcDNA3.1-DLK-Mutanten (Seite 53)

Tabelle 2.3: Primer der pMAL-MBP-TEV-DLK-Konstrukte (Seite 55)

Tabelle 2.4: Primer zur Genotypisierung der Mäuse (Seite 56)

Tabelle 2.5: PCR-Protokolle zur Genotypisierung der Mäuse (Seite 57)

Tabelle 2.6: Korrelation zwischen % Acrylamid und Molekulargewicht kDa (Seite 64)

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (Seite 64)

Tabelle 2.8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper zur immunocytochemischen Färbungen (Seite 83)

Tabelle 2.9: Verwendete Primär- Sekundärantikörper zur immunhistologischen Färbungen (Seite 102)

Tabelle 2.10: Rehydrieren von Gewebeparaffinschnitten (Seite 104)

Tabelle 2.11: Dehydrieren von Gewebeparaffinschnitten (Seite 105)

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Das Pankreas und seine Funktion

Die Bauchspeicheldrüse (das Pankreas) ist eine endoderm-abgeleitete Drüse, die aus zwei Organen besteht: dem exokrinen und dem endokrinen Pankreas.

Das exokrine Pankreas bildet 95% der gesamten Pankreasmasse und produziert und sezerniert Verdauungsenzyme in das Duodenum. Diese Verdauungsenzyme dienen der Eiweißspaltung (sog. Proteasen), beispielsweise (Chemo-) Trypsinogen und Elastase; in Form von Alpha-Amylase oder Ribonukleasen der Kohlenhydratspaltung oder als Lipasen der Fettsäurespaltung. Der sezernierte Pankreassaft wird über ein System von Kanälen - dem Duktalsystem - in das Duodenum transportiert (Benitez et al., 2012; Afelik und Rovira, 2017; Shih et al., 2013; Review Longnecker, American Pancreatic Association, 2014).

Die endokrine Komponente des Pankreas besteht aus Inselzellen (sog. Langerhans'sche Inseln, nach Paul Langerhans, 1847-1888) und stellt 1 - 5% der gesamten Pankreasmasse dar (Benitez et al., 2012; Review Longnecker, American Pancreatic Association, 2014). Die Langerhans'schen Inseln bestehen aus mehreren Zelltypen, die Hormone produzieren und diese direkt in den Blutkreislauf freisetzen. Die insulinproduzierenden β -Zellen bilden mit einem Anteil von 60 - 80% den am häufigsten vertretenden Zelltyp an humanen Inselzellen. Die α -Zellen, welche Glukagon produzieren, sind mit 15 - 20% im humanen endokrinen Pankreas vertreten. Beide Hormone sind funktionelle Gegenspieler und sorgen für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase. Des Weiteren wird Somatostation (aus δ -Zellen), pankreatisches Polypeptid (aus PP-Zellen) und Ghrelin (aus ϵ -Zellen) in den Langerhans'schen Inseln synthetisiert und sezerniert (Oliver-Krasinski und Stoffers, 2008; The Pancreas Center, Columbia University, 2016; Afelik und Rovira, 2017).

1.1.2 Definition und Prävalenz des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, auch Zuckerkrankheit genannt, ist ein Oberbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels, die sich durch eine Hyperglykämie auszeichnen. Die gestörte Glukosetoleranz mit postprandial erhöhten Blutzuckerspitzen wird mit Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, verschwommenem Sehen sowie in einigen Fällen mit einer Polyphagie symptomatisch. Die persistierenden Folgen äußern sich in der Dysfunktion verschiedener Organe, am häufigsten betroffen sind Augen (Retinopathie), Niere (Nephropathie), Nervensystem (Neuropathie) sowie Herz und Blutgefäße (kardiovaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck) und können letztlich lebensbedrohliche Komplikationen auslösen (American Diabetes Association, Diabetes Care 2004). An der Entstehung des Diabetes mellitus sind verschiedene pathogene Prozesse beteiligt, wie die Autoimmunzerstörung von β -Zellen der Bauchspeicheldrüse oder Anomalien in Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Komplexe genetische oder umweltbedingte Faktoren können zu einer verminderten Insulinsekretion in den β -Zellen, einer verminderten Wirkung des Insulins, einer verminderten Glukoseverwertung und zu einer erhöhten Glukoseproduktion führen (Beck-Nielsen, 2002).

Diabetes mellitus ist eine der weltweit am stärksten zunehmenden chronischen Stoffwechselerkrankungen. Wie die International Diabetes Federation (IDF) in der 7. Auflage des Diabetes Atlas veröffentlichte, litten im Jahr 2015 geschätzt 415 Millionen Erwachsene (20 - 79 Jahre) weltweit an dieser Erkrankung. Prognosen zufolge werden im Jahr 2040 642 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt sein. Die Einschätzung basiert einerseits auf den 318 Millionen geschätzten Erwachsenen, welche bereits heute eine beeinträchtigte Glukosetoleranz aufweisen und damit ein hohes Risiko besitzen in der Zukunft zu erkranken, sowie auf den demographischen Veränderungen bezüglich Umwelt, Verhalten und Lebensstil. Angesichts der kardio- und cerebrovaskulären Folgeerkrankungen des Diabetes wie Myokardinfarkt und Schlaganfall ist eine zuverlässige antidiabetische Therapie unerlässlich. Diabetes mellitus einschließlich seiner weiterreichenden Komplikationen belasten derzeit nicht nur enorm das Gesundheitssystem, sondern stellen die häufigste Todesursache in den meisten Länder dar (Abbildung 1.1).

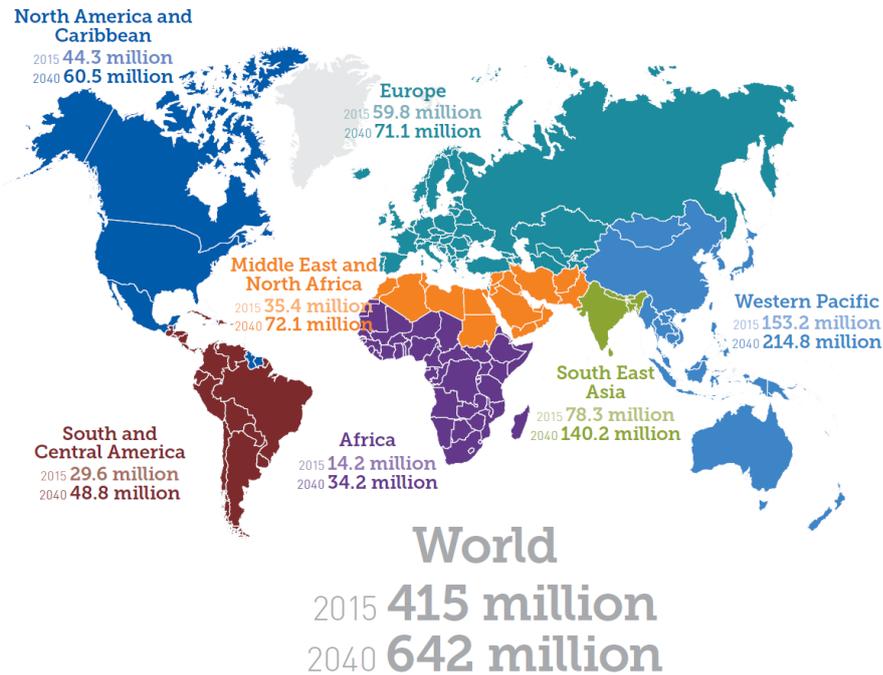


Abbildung 1.1: Schätzungen von Menschen mit Diabetes mellitus weltweit und pro Region. Geschätzte Anzahl von Erwachsenen (20 - 79 Jahre) mit Diabetes mellitus weltweit und pro Region im Jahr 2015 und 2040 (International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 7. Auflage).

1.1.3 Diagnose, Klassifikation und Therapie des Diabetes mellitus

2006 wurden die noch aktuell geltenden Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *engl. World Health Organisation*) für die Diagnostik des Diabetes mellitus und der intermediären Hyperglykämie veröffentlicht. Demnach liegt ein Diabetes vor, wenn mindestens eine der folgenden Kriterien auftreten: Nüchtern-Plasmaglukose (NPG) $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL) oder zweistündige Plasmaglukose $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) nach einer oralen Einnahme von 75 g Glukose (oraler Glukose-Toleranztest, OGTT). Der HbA1c-Wert (Glykohämoglobin; Hämoglobin an dem Glukose gebunden ist) oder Langzeit-Blutzuckerwert wird ebenfalls zur Diagnose des Diabetes mellitus herangezogen. Der Anteil an glykosyliertem Hämoglobin bietet eine Auskunft über den Blutzuckerwert der letzten 8 - 12 Wochen (Lebensdauer der Erythrozyten). Der Wert wird in Prozent angegeben und der Norm-Bereich liegt bei 4,0 - 6,0%. Derzeit gilt der HbA1c-Wert

aufgrund seiner Ungenauigkeit nicht mehr als geeigneter diagnostischer Test für Diabetes mellitus oder intermediäre Hyperglykämie (WHO report/IDF consultation, 2006; Pajunen et al., 2011).

Die Weltgesundheitsorganisation veröffentlichte 1965 erstmals Empfehlungen zur Klassifikation des Diabetes mellitus. Diese wurden in den Jahren 1980 und 1985 entsprechend neuer signifikanter Erkenntnisse in den diagnostischen Kriterien und Klassifizierung verändert. Heute erfolgt die Klassifikation des Diabetes mellitus nach den zu Grunde liegenden Pathomechanismen (Kuzuya und Matsuda, 1997; Gabor et al., 2000). Demnach wird der Diabetes mellitus (DM) in vier Hauptgruppen unterschieden: Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2, Gestationsdiabetes und sogenannte andere spezifische Formen.

Typ 1 (DM1) oder „juvener Diabetes“ (früher IDDM, *engl. insulin-dependent DM*) ist charakterisiert durch einen absoluten Insulinmangel aufgrund einer Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Eisenbarth et. al, 1986). Diese Form des Diabetes mellitus betrifft 5 - 10% aller Patienten mit Diabetes: in den meisten Fällen (85 - 90%) handelt es sich um einen immunvermittelten Diabetes, den DM Typ 1a. Die Inselzellen unterliegen sowohl einer T-zellvermittelten Entzündungsreaktion als auch eine B-Zellantwort, die sich in der Produktion von Antikörpern, die gegen β -Zellantigene gerichtet sind, äußert (Daneman, 2006). Der Diabetes mellitus Typ 1b (idiopathischer Diabetes) wird diagnostiziert, wenn die Patienten eine permanente Insulinopenie ohne jegliche immunologische Hinweise auf eine β -Zellautoimmunität aufweisen. Diese Diabetesform kommt in seltenen Fällen vor und betrifft meist Patienten afrikanischer oder asiatischer Abstammung. Tritt Diabetes mellitus Typ 1 im Erwachsenenalter auf, so spricht man von einem *late onset autoimmunity diabetes in the adult* (LADA) (WHO, 1999; American Diabetes Association, 2014). Diese Form des DM1 ist mit 9,1% erwachsenen Diabetikern die prävalente Form in Europa (Hawa et al., 2013). Patienten, welche anhand der Symptomatik (siehe Kapitel 1.1.1) oder aufgrund einer Ketoazidose (Stoffwechselübersäuerung durch Ketonkörper) mit DM1 klinisch apparent werden, sind lebenslanglich auf Insulin angewiesen.

Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) oder „Altersdiabetes“ (früher als NIDDM, *engl. non-insulin-dependent DM*) wird durch einen relativen Insulinmangel mit peripherer Insulinresistenz und einer inadäquaten Insulinsekretion und -biosynthese

charakterisiert. Der Typ 2 Diabetes ist mit 90 - 95% die weltweit häufigste Form des Diabetes, wobei Adipositas als der wichtigste Risikofaktor gilt (Kahn et al., 2014; Donath et al., 2011). Des Weiteren sind genetische Prädisposition, unzureichende körperliche Bewegung sowie Malnutrition bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 maßgebend (Stumvoll et al., 2005). Eine verminderte Glukoseaufnahme in das Fettgewebe und in die Skelettmuskulatur sind die Folgen einer peripheren Insulinresistenz. So scheint diese die primäre Ursache für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 zu sein. Der prädiabetische Zustand ist durch eine β -Zellhypertrophie und -hyperplasie mit einer gesteigerten Insulinbiosynthese und -sekretion gekennzeichnet, um die gesteigerte Glukoseaufnahme zu kompensieren (Maedler und Donath, 2004; Rhodes, 2005). Erst die Dekompensation der β -Zelle mit einer relativ zu niedrigen Insulinbiosynthese und -sekretion sowie der Verlust der β -Zellmasse führen zum klinisch apparenten Bild des Diabetes mellitus Typ 2 (Kahn, 1994; Leahy et al., 1990; Donath and Halban, 2004).

Der Krankheitsverlauf ist schleichend, was eine frühzeitige Diagnose erschwert. Die Grundlage der Therapie ist eine Ernährungsumstellung und ausreichende körperliche Bewegung. Häufig wird die medikamentöse Behandlung mit oralen Antidiabetika erforderlich. Hierzu zählen vor allem Biguanide mit Metformin als einzigem Vertreter (1. Wahl), Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid, Sulfonylharnstoff-Analoga wie Repaglinid, DPP-4-Inhibitoren (Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren) wie Sitagliptin, SGLT-2 Inhibitoren wie Dapaglifozin, alpha-Glucosidase-Hemmstoffe wie Acarbose, und sogenannte Insulin-Sensitizer (Pioglitazon). Im späteren Krankheitsverlauf ist eine Insulinsubstitution jedoch unausweichlich, wobei häufig Verzögerungsinsuline wie das Neutral-Protamin Hagedorn-Insulin (NPH-Insulin) eingesetzt werden (Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Nationale Versorgungsleitlinie, 2014; Kaiser und Oetjen, 2014).

Hyperglykämische Zustände während der Schwangerschaft (1 - 4% aller Schwangerschaften) werden in Schwangerschaftsdiabetes mellitus (leicht erhöhte Blutzuckerwerte) oder Diabetes mellitus in der Schwangerschaft (Diabetes mellitus) unterteilt. Zur Unterscheidung beider Typen werden Parameter wie die Nüchtern-Plasmaglukose (NPG) und die einstündige oder zweistündige Plasmaglukose gemessen. Die NPG bei einem Schwangerschaftsdiabetes liegt zwischen 5,1 - 6,9 mmol/L (92 - 125 mg/dL); die OGTT nach einer Stunde bei $\geq 10,0$ mmol/L

(180 mg/dL) und nach zwei Stunden zwischen 8,5 - 11,0 mmol/L (153 - 199 mg/dL) nach 75 g oraler Glukoseeinnahme (United Nations, 2013). Therapiert werden beide Formen mit Insulin, sobald eine gesunde Ernährung und Bewegung nicht ausreichen (Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Nationale Versorgungsleitlinie, 2014).

Sogenannte weitere spezifische Formen des Diabetes mellitus treten mit großer Seltenheit auf und werden nach der Ursache der Dysfunktion unterschieden. MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) gehört zu den prominenteren monogenen Defekten der β -Zellen (genetische Defekte der β -Zelle). Diese Form zeichnet sich durch eine beeinträchtigte Insulinproduktion und Insulinsekretion bei minimaler oder gar keiner Beeinträchtigung der Insulinwirkung aus. Des Weiteren kann ein Diabetes mellitus durch genetische Defekte in der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Infektionen, Endokrinopathien (z.B. Cushing Syndrom) und durch Chemikalien oder Arzneimittel induziert werden (z.B. durch Glukokortikoide, Ciclosporin und Tacrolimus) oder mit anderen genetischen Syndromen assoziiert sein (WHO report/IDF consultation, 2006; Fernandez et al., 1999; Reddy et al., 2015).

1.2 Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK)

DLK gehört zu der Gruppe der Mixed-Lineage Kinasen (MLK) (Holzman et al., 1994) und führt als Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 12 (MAP3K12) zu der Aktivierung der untergeordneten Kinasen MKK4/7 und MKK3/6 (MAP2K), die ihrerseits die MAPK JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen phosphorylieren und damit aktivieren (Fan et al., 1996). Die DLK wird überwiegend im zentralen sowie im peripheren Nervensystem, in den primären Langerhans'schen Inseln des Pankreas und in β -Zellen exprimiert (Holzman et al., 1994; Hirai et al., 2005; Oetjen et al., 2006; Oetjen und Lemcke, 2016).

Die MLK-Familie besteht aus fünf verschiedenen Mitgliedern: MLK1, MLK2 (auch MST genannt), MLK3 (auch SPRK oder PTK1 genannt), Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK) und Leucine-Zipper Kinase (LZK, MAP3K13). Dabei werden folgende Homologe der DLK unterschieden: Leucine-Zipper Protein (ZPK, human); MAPK Upstream Kinase (MUK, Ratte) und Wallenda (*Drosophila melanogaster*) (Holzman et al., 1994; Sakuma et al., 1997; Reddy et al., 1994; Hirai et al., 1996, Collins et al., 2006; Xu et al., 2001).

EINLEITUNG

Die DLK, ein 888 Aminosäure großes Protein, wurde erstmals 1994 von Holzman et al., aus einer embryonalen Mausniere isoliert. Die murine DLK besitzt eine apparente Masse von 130 kDa (rechnerisch 96 kDa) (Mata et al., 1996). Ihre katalytische Domäne befindet sich zwischen den Aminosäuren Glu-156 und Val-404, welche in der Primärstruktur den Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen homolog ist, funktionell jedoch nur als Serin/Threonin-Kinase fungiert (Holzman et al., 1994; Gallo et al., 2002). Innerhalb dieser Domäne ist die ATP-Bindungsstelle (Lys-185) lokalisiert. Mutation von Lysin in Alanin an der ATP-Bindungsstelle verhindert die ATP-Bindung, wodurch die DLK katalytisch inaktiviert wird (Mata et al., 1996). Die DLK verfügt über zwei durch einen kurzen *Spacer* getrennte Leucine-Zipper-Domänen (Glu-421 - Arg-449 und Leu-472 - Cys-501). Diese ermöglichen die Bildung von Homodimeren, wodurch die DLK vermutlich autophosphoryliert und enzymatisch aktiviert wird (Leung und Lassam, 2001; Nihalani et al., 2001; Huntwork-Rodriguez et al., 2013). Zerstörung der Leucine-Zipper verhindert die JNK-Phosphorylierung durch DLK (Nihalani et al., 2000). Des Weiteren besitzt die DLK eine zweigeteilte nukleäre Kernerkennungssequenz (NLS, *engl. nuclear localization sequence*) und ein nukleäres Exportsignal (NES, *engl. nuclear export signal*). Die NLS erstreckt sich über die Aminosäuren von Lys-185 bis His-203 (Wallbach et al., 2016). Die NES ist innerhalb des zweiten Leucine-Zippers (Leu-481 bis Leu-485) lokalisiert (diese Arbeit, Wallbach et al., 2016). Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende der DLK weist Glycin- und Prolin-reiche Sequenzen auf (Holzman et al., 1994; Hirai et al., 1996). Der schematische Aufbau der Primärstruktur der DLK kann der Abbildung 1.2 entnommen werden.

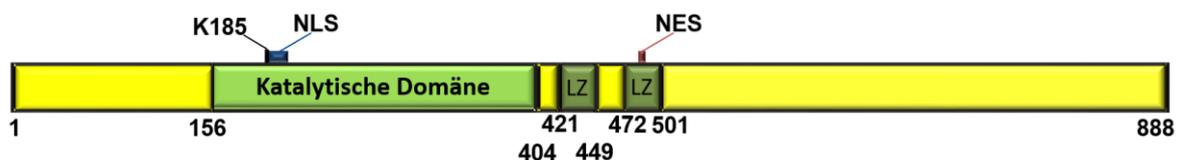


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Primärstruktur der murinen DLK. K185 = ATP-Bindungsstelle (K = Lysin); LZ = Leucine-Zipper-Domäne; NLS = Kernerkennungssequenz; NES = nukleäres Exportsignal. Zahlen repräsentieren die jeweilige Aminosäurestelle (Mod. Holzman et al., 1994).

1.2.1 DLK-Signalweg

Die DLK-Aktivität wird zumindest teilweise durch die Assoziation mit dem Gerüstprotein *Islet-Brain1/c-Jun amino-terminal kinase Interacting Protein-1* (IB1/JIP-1) reguliert. Unter basalen Bedingungen bindet monomere unphosphorylierte katalytisch inaktive DLK an IB1/JIP-1. Die Phosphorylierung des Gerüstproteins an den Tyrosinresten 375 und 413 durch die Familie der Src-Kinasen verstärkt diese Wechselwirkung, wodurch DLK in ihrem katalytisch inaktiven Zustand verbleibt (Nihalani et al., 2007). Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung von IB1/JIP-1 am Thr-103 durch JNK zur Dissoziation von DLK. DLK homodimerisiert über ihre Leucine-Zipper-Domäne, und wird - vermutlich durch Autophosphorylierung - katalytisch aktiv (Nihalani et al., 2003; Leung und Lassam 2001; Oetjen und Lemcke, 2016).

Die DLK scheint für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der Zellfunktion unverzichtbar zu sein, beispielsweise für das Axonwachstum, die neuronale Migration der sich entwickelnden Hirnrinde (Brancho et al., 2005, Eto et al., 2009; Hirai et al., 2006; Bisson et al., 2008) und die Elongation sowie Regeneration von Neuronen (Hammarlund et al., 2009). Das konstitutive Ausschalten dieser Kinase führt in Mäusen zum perinatalen Tod (Hirai et al., 2006; Itoh et al., 2011).

Der wichtigen Rolle der DLK für den Organismus steht eine Beteiligung an der Degeneration von Axonen gegenüber (Miller et al., 2009). So führt die Aktivierung der DLK im Gehirn von adulten Mäusen (8 Wochen) zur Neurodegeneration (Chen et al., 2008). Darüber hinaus induziert die enzymatisch aktive DLK Apoptose in einer neuronalen Zelllinie, einer Fibroblasten-Zelllinie und in der pankreatischen β -Zelllinie HIT (Xu et al., 2001; Parkash et al., 2005; Rhodes, 2005; Chen et al., 2008; Plaumann et al., 2008). Des Weiteren stimuliert die Hemmung von Calcineurin durch die Immunsuppressiva Ciclosporin und Tacrolimus die enzymatische Aktivität der DLK, was anschließend zu einer Verminderung der β -Zellmasse führt (Oetjen et al., 2006; Plaumann et al., 2008). Humanes Apolipoprotein E (ApoE) 2, 3 und 4, wobei 4 als der wichtigste genetische Risikofaktor für Alzheimer gilt, binden an die ApoE-Rezeptoren, wodurch die DLK aktiviert wird. Die Aktivierung der DLK-Signalkaskade führt über die Aktivierung von MKK7 und ERK1/2 (*engl. Extracellular-signal Regulated Kinases*) zur Phosphorylierung von c-Fos und zu

der vermehrten Transkription von Amyloid- β -Vorläuferproteinen (APP). Hohe Amyloid- β -Spiegel tragen zur Entstehung von Alzheimer bei (Huang et al., 2017).

In verschiedenen Geweben aktiviert DLK den JNK- und p38-Signalweg über die Aktivierung von MKK4 und MKK7 (Fan et al., 1996; Merritt et al., 1999; Hirai et al., 2006; Oetjen et al., 2006). Die Aktivierung des JNK-Signalweges setzt eine Autophosphorylierung der DLK voraus (Nihalani et al., 2000), welche am Ser-302 innerhalb der Aktivierungsschleife der DLK stattfindet. Mutation des Ser-302 in Alanin vermindert die enzymatische Aktivität der DLK und die JNK-Phosphorylierung (Börchers et al., in Revision). Ferner ist bekannt, dass CEP-1347- ein potenter und selektiver Inhibitor des JNK-Signalweges- die DLK-induzierte JNK-Phosphorylierung reduziert (Ferraris et al., 2013; Maroney et al., 2001).

Durch Aktivierung der DLK wird die Kinase JNK an Thr-183 und Tyr-185 phosphoryliert, was zu einer verstärkten Apoptoseinduktion führt (Gallo und Johnson, 2002; Donath et al., 2003; Shoelson et al., 2006) (Abbildung 1.3).

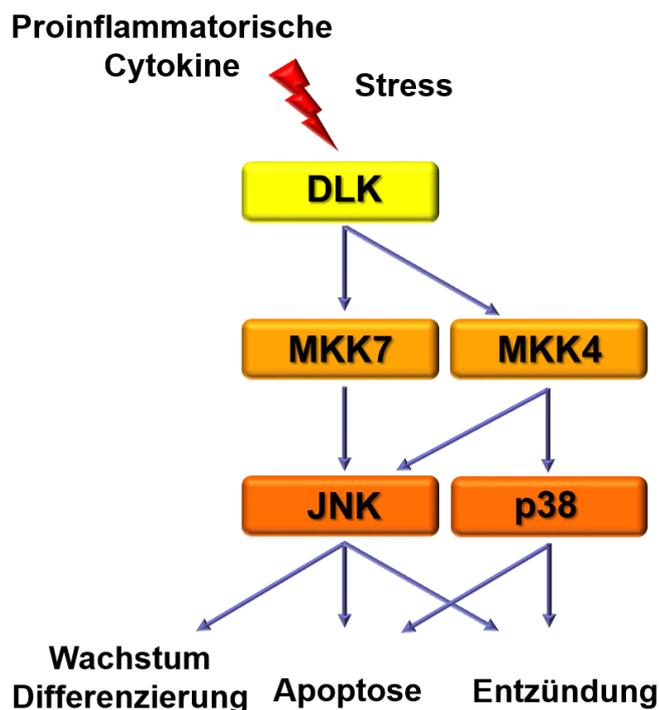


Abbildung 1.3: DLK-Signalkaskade. Die DLK wird z.B. durch proinflammatorische Cytokine oder Stress aktiviert. Aktive DLK phosphoryliert die untergeordneten Kinasen MKK4/7, welche zu einer Aktivierung von JNK und p38 führt. Die Aktivierung dieser Signalkaskade führt zu verschiedenen Arten der Zellantwort wie z.B. Apoptose (Mod. Gallo und Johnson, 2002).

1.3 Der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*)

Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) trägt zur Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und β -Zellmasse bei (Oetjen et al., 2003a, 2003b, 2006; Plaumann et al., 2008; Wallbach et al., 2016). Die transkriptionelle Aktivität von CREB wird durch verschiedene Signale wie Calcium, cAMP, extrazelluläre signalregulierte Kinasen (ERK1/2) und p38 MAPK (Habener et al., 1995; Mayr und Montminy 2001) induziert. Die stimulierte CRE- (*cAMP response element*) abhängige Gentranskription sowie die transkriptionelle Aktivität von CREB, CBP (*CREB binding protein*) und CRTC1 (*cAMP regulated transcriptional coactivator 1*) wird durch Aktivierung der DLK gehemmt (Oetjen et al., 2006; Phu et al., 2011). Mäuse mit β -zellspezifisch inaktiviertem CREB entwickeln Diabetes durch reduzierte Proliferation und erhöhte β -Zellapoptose (Jhala et al., 2003).

CREB vermittelt die Aktivierung von cAMP-responsiven Genen durch Bindung als Dimer an ein konserviertes cAMP-responsives Element (CRE), 5'-TGACGTCA-3' oder an CRE-Halbstellen 5'-CGTCA-3' ; 5'-TGACG-3'. Eine Akkumulation von cAMP in der Zelle induziert die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche als Heterotetramer inaktiv im Cytoplasma vorliegt. Aktive PKA phosphoryliert CREB am Ser-133, wodurch der Koaktivator CBP rekrutiert wird. Der zweite CREB-Koaktivator CRTC liegt unter basalen Bedingungen phosphoryliert im Cytosol vor. Eine Dephosphorylierung von CRTC (z.B. durch Calcineurin) führt zu einer nukleären Translokation dieses Koaktivators und zur anschließenden Gentranskription. Im Kern bindet CRTC an den dimerisierten Leucine-Zipper von CREB (Mayr und Montminy, 2001; Sreaton et al., 2004; Altarejos und Montminy, 2011).

1.4 Calcineurin

Die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin (CN), welche auch als Protein Phosphatase 2B (PP2B) und Protein Phosphatase 3 (PP3) bezeichnet wird, gehört ebenso wie die Protein Phosphatase 1 (PP1) und die Protein Phosphatase 2A (PP2A) zur Familie der Serin/Threonin Protein Phosphatasen

EINLEITUNG

(Vasauskas et al., 2014; Grigoriu et al., 2013). Calcineurin wird ubiquitär exprimiert (am stärksten im Gehirn), wobei sie durch Dephosphorylierung diverser Substrate sowohl Entwicklung, Herzfunktion, Immunantwort, Lernen und Gedächtnis, Muskeldifferenzierung als auch die Pankreas- β -Zellfunktion reguliert (Grigoriu et al., 2013; Rodriguez et al., 2009). CN ist ein Heterodimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit A (CNA) und einer regulatorischen Untereinheit B (CNB). Die katalytische Untereinheit besitzt neben der Phosphatase-Domäne auch eine regulatorische Region, die durch eine Linker-Sequenz bestehend aus 13 Aminosäuren verknüpft ist. In dieser regulatorischen Region befinden sich eine CNB-bindende Domäne (BBD), eine Calmodulin-bindende Domäne (CaM) und eine autoinhibitorische Domäne (AID) (Abbildung 1.4). Die AID bindet in Abwesenheit von Calcium und Calmodulin an die katalytisch aktive Seite des CN (Rusnak und Mertz, 2000; Klee et al., 1998; Li et al., 2011; Rodriguez et al., 2009; Aitken et al., 1984). Die regulatorische Untereinheit B (CNB) ist für das Binden von vier Ca^{2+} -Molekülen verantwortlich, was zur Aktivierung dieser Phosphatase führt. Nicht nur extrazelluläres Calcium, sondern auch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Reservoiren durch Thapsigargin (ein spezifischer Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums und des sarkoplasmatischen Retikulums) führt zur Aktivierung von Calcineurin in Kardiomyozyten (Turner et al., 2009; Vasauskas et al., 2014).



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Primärstruktur und Domänenstruktur von Calcineurin A (katalytische Untereinheit A). BBD = Calcineurin B-bindende Domäne; CaM = Calmodulin-bindende Domäne; AID = autoinhibitorische Domäne. Die Aminosäuresequenz stellt die Calcineurin A α -Isoform der Ratte dar, die von Saitoh et al., 1991 publiziert wurde. Die Zahlen repräsentieren die jeweilige Aminosäurestelle (Mod. Rusnak und Mertz, 2000).

Die Aktivierung von Calcineurin ist für die CRE/CREB-abhängige Gentranskription erforderlich. Die Immunsuppressiva Ciclosporin und Tacrolimus hemmen die CRE-abhängige Gentranskription (Krüger et al., 1997). Diese Hemmung wird sowohl durch Hemmung des CREB-Koaktivators CBP (Oetjen et al., 2005) als auch des

CREB-Koaktivators CRTC (Screaton et al., 2004) hervorgerufen. Die Aktivierung von Calcineurin führt zur Dephosphorylierung vom cytoplasmatischen CRTC, welches in den Zellkern wandert und die CREB-abhängige Gentranskription induziert (Bittinger et al., 2004). Die am besten untersuchten Targets von Calcineurin sind die Transkriptionsfaktoren NFAT (*engl. nuclear factor of activated T-cells*) (Crabtree und Olson, 2002; Hogan et al., 2003). Unter basalen Bedingungen befinden sich NFAT-Proteine im inaktiven phosphorylierten Zustand im Cytoplasma. Aktivierung von Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert NFAT-Proteine, welche in den Kern wandern und die Gentranskription induzieren (Hogan et al., 2003; Rodriguez et al., 2009). Damit Calcineurin NFAT dephosphorylieren kann, ist die Interaktion beider Proteine notwendig (Rodriguez et al., 2009; Roy und Cyert, 2009; Grigoriu et al., 2013). Die am gründlichsten erforschte Bindungsstelle befindet sich am N-Terminus der regulatorischen Domäne von NFAT und hat die Konsensussequenz PxlxIT (Aramburu et al., 1999; Li et al., 2007; Roy und Cyert, 2009). NFAT interagiert zusätzlich mit CN über eine zweite Bindungsstelle mit dem Konsensusmotif LxVP (Liu et al., 2001; Martínez-Martínez et al., 2006; Roy und Cyert, 2009). Das LxVP-Motif befindet sich am C-Terminus der regulatorischen Region und ist in allen NFAT-Proteine konserviert (Martínez-Martínez et al., 2006; Roy und Cyert, 2009). Ein Peptid mit dem LxVP-Motif von NFATc1 kompetiert die Interaktion zwischen NFAT und aktivem Calcineurin und hemmt die Calcineurin-Aktivität (Martínez-Martínez et al., 2006).

Die Hemmung des NFAT-Signalweges unterdrückt die T-Zellaktivierung, was zur Vermeidung der Organabstoßung nach einer Organtransplantation therapeutisch genutzt wird. Die spezifischen Inhibitoren von Calcineurin Ciclosporin (CsA, ein cyclisches Peptid) und Tacrolimus (FK506, ein Makrolid) werden zu diesem Zweck eingesetzt (Musson und Smit, 2011; Grigoriu et al., 2013). Um Calcineurin zu hemmen müssen beide Stoffe Komplexe mit den spezifischen Immunophilinen Cyclophilin (Cyp für CsA) sowie mit dem FK506-bindenden Protein (FKBP12) bilden (Cardenas et al., 1995; Liu et al., 1991; Rodriguez et al., 2009; Grigoriu et al., 2013). Diese Immunsuppressivum-Immunophilin (IS-IP)-Komplexe interagieren mit einer hydrophoben Tasche des Calcineurin an der Verbindungsstelle der CNA- und CNB-Untereinheiten (Griffith et al., 1995; Huai et al., 2002; Jin und Harrison, 2002; Kissinger et al., 1995; Grigoriu et al., 2013).

1.5 Rolle der DLK und Calcineurin zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2

Erst die Dekompensation der β -Zelle mit Dysfunktion und Verlust der Masse führt zum klinisch apparenten Bild des Diabetes mellitus Typ 2 (Leahy, 1990; Donath und Halban, 2004). Über welche molekularen Mechanismen diese β -Zelldekomensation zustande kommt, wird heute noch diskutiert. Neben den proinflammatorischen Cytokinen $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ trägt die Glukotoxizität, hervorgerufen durch erhöhte postprandiale und basale Blutzuckerspiegel, zu der Dekompensation der β -Zelle bei (Donath et al., 2014; Nishikawa et al., 2000; Du et al., 2000). Die Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK) scheint eine wichtige Rolle für die Dekompensation der β -Zelle zu spielen: Überexpression von DLK in der insulinproduzierende β -Zelllinie HIT-T15 (Hamster Insulinoma Tumor) hemmt die Insulingentranskription und -sekretion. Die Stimulation der DLK untergeordneten Kinase JNK (c-Jun N-terminale Kinase), die zu der Degradation des β -zellspezifischen Transkriptionsfaktors MafA führt, ist ein zugrundeliegender Pathomechanismus (Stahnke et al., 2014) (Abbildung 1.5). DLK hemmt ebenfalls die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (Oetjen et al., 2006; Phu et al., 2011; Wallbach et al., 2016; Börchers et al., in Revision). Angesichts der Bedeutung von CREB für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und -masse (Jhala et al., 2003; Hussain et al., 2006; Costes et al., 2009; Shin et al., 2014) könnte dieser Mechanismus zu der DLK induzierten β -Zellapoptose beitragen (Plaumann et al., 2008; Wallbach et al., 2016; Börchers et al., in Revision).

In HIT-T15 Zellen wird die subzelluläre Lokalisation der DLK durch die proinflammatorischen Cytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ reguliert. Beide prädiabetischen Signale induzieren die Translokation der Kinase von Cytosol in den Zellkern. Die nukleäre Lokalisation ist Voraussetzung für die Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription und Apoptoseinduktion durch DLK (Wallbach et al., 2016), wobei ausschließlich $\text{TNF}\alpha$ die enzymatische Aktivität dieser Kinase stimuliert (Börchers et al., in Revision).

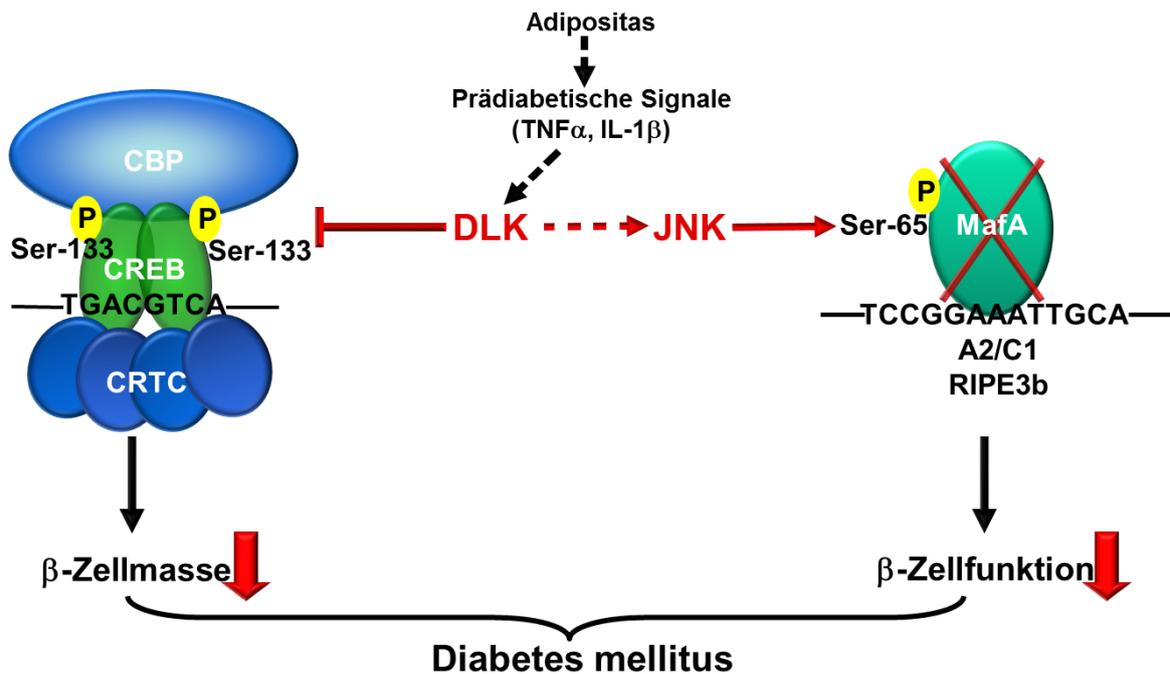


Abbildung 1.5: Verminderung der β -Zellmasse und β -Zellfunktion durch DLK führt zu Diabetes mellitus. Die im adipösen Zustand vermehrt gebildeten proinflammatorische Cytokine TNF α und IL-1 β führen als prädiabetische Signale zu der nukleären Lokalisation von DLK. Kernlokalisierung dieser Kinase führt zu einer Hemmung des CBP/CREB/CRTC-Transkriptionskomplexes und zu einer Verminderung der β -Zellmasse. DLK ist auch in der Lage, über eine Phosphorylierung von JNK den β -zellspezifischen Transkriptionsfaktor MafA zu degradieren. Diese MafA-Degradation führt zu einer verminderten β -Zellfunktion mit reduzierter Insulinbiosynthese und Insulinsekretion (Mod. Oetjen, 2016).

Die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase scheint ebenfalls an der Regulation von DLK beteiligt zu sein (Mata et al., 1996). In HIT-T15 Zellen vermindert die Überexpression von Calcineurin die DLK-induzierte Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription (Oetjen et al., 2006). Die strukturell unterschiedlichen Immunsuppressiva Ciclosporin und Tacrolimus, deren einzige Gemeinsamkeit in der Hemmung von Calcineurin besteht, reduzieren die CRE/CREB-abhängige Gentranskription (Krüger et al., 1997; Oetjen et al., 2005; Screaton et al., 2004) und stimulieren die enzymatische Aktivität von DLK in HIT-T15 Zellen (Plaumann et al., 2008). Calcineurin selbst scheint eine besondere Rolle für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und -masse zu spielen. So ist eine wichtige unerwünschte Wirkung der immunsuppressiven Therapie mit Ciclosporin oder Tacrolimus der Posttransplantationsdiabetes, der dem Diabetes mellitus Typ 2 ähnelt (Fernandez et al., 1999; Reddy et al., 2015). Transgene Mäuse, in denen die regulatorische Calcineurin Untereinheit B1 deletiert ist, werden diabetisch (Heit et al.,

2006). Die Behandlung von HIT-T15 Zellen mit reaktiven Sauerstoffspezies, die im Rahmen einer Glukotoxizität erhöht sind, hemmen Calcineurin und aktivieren DLK (Kutschenko, med. Diss. Göttingen, 2007).

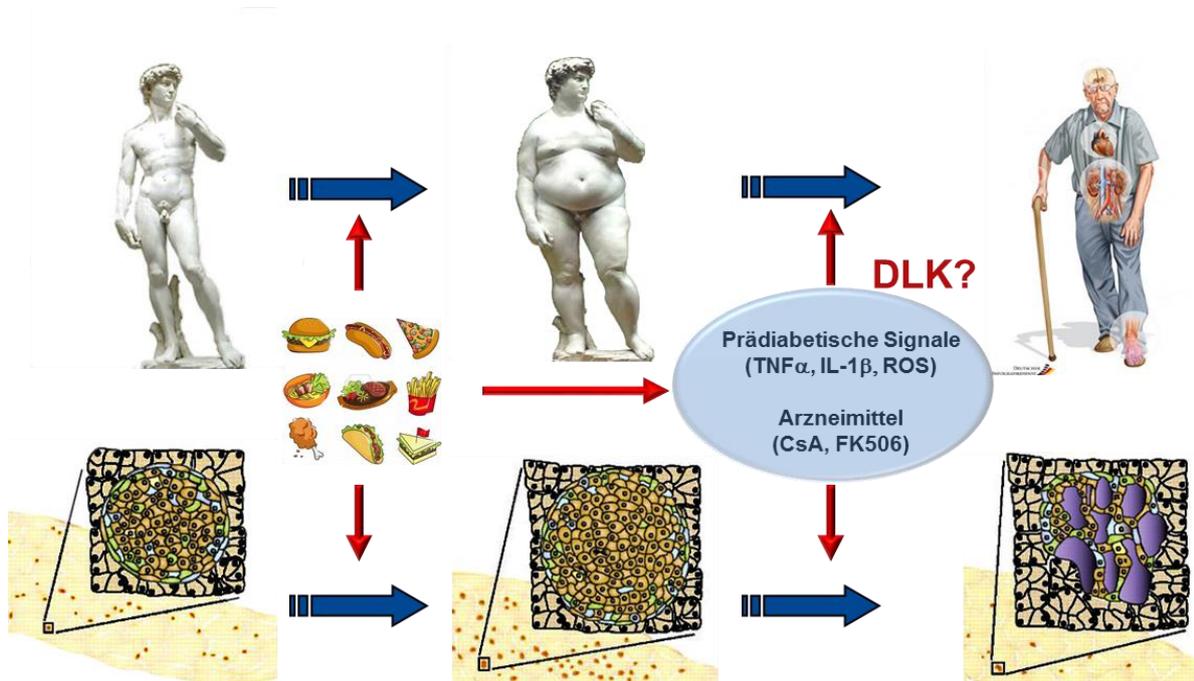


Abbildung 1.6: DLK und Calcineurin in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2. Fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel tragen zur Entwicklung von Adipositas bei. Im adipösen Zustand treten Hypertrophie und Hyperplasie der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse auf, um die hohen Glukosemengen mit einer erhöhten Produktion an Insulin zu kompensieren. Prädiabetische Signale wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden vermehrt gebildet. Es kommt zu einem Verlust der β -Zellmasse, welche mit einem Verlust der β -Zellfunktion (Insulinbiosynthese, Insulinsekretion) einhergeht und zur Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 führt. Die spezifische Hemmung von Calcineurin durch Ciclosporin (CsA) und Tacrolimus (FK506) führen zum Posttransplantationsdiabetes. Folgeerkrankungen eines Diabetes mellitus sind u.a. Neuropathien, Retinopathien, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephropathien und der diabetische Fuß. Die prädiabetischen Signale $\text{TNF}\alpha$ und ROS sowie die Immunsuppressiva CsA und FK506 führen zur enzymatischen Aktivierung der DLK, wobei ROS, CsA und FK506 Calcineurin inhibieren (Mod. Rhodes, 2005).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die β -zellschädigende Dual Leucine-Zipper Kinase durch die β -zellprotektive Phosphatase Calcineurin reguliert

wird. Dazu sollte auf Basis von *in silico* Analysen putative Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK identifiziert werden. Die fehlende Interaktion dieser DLK-Mutanten mit Calcineurin und ihre Folgen für die enzymatische Aktivität der Kinase und für den Verlust der β -Zellmasse und der β -Zellfunktion sollte in der β -Zelllinie HIT-T15 untersucht werden. In Verbindung mit bereits vorhandenen Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Elke Oetjen sollten diese Ergebnisse den Nachweis erbringen, dass die Dephosphorylierung der DLK durch Calcineurin zu der β -zellprotektiven Wirkung dieser Phosphatase beiträgt. Diese Erkenntnis könnte die DLK als mögliche Ursache für die Entwicklung eines Posttransplantationsdiabetes nach Behandlung mit den spezifischen Calcineurin Inhibitoren Ciclosporin und Tacrolimus identifizieren. Ferner sollte in Kooperation mit Dr. Thomas Lemcke (Molecular Modelling, Institut für Pharmazie, Hamburg) die Regulation der DLK durch den Vergleich auf molekularbiologischer Ebene auf Basis der von ihm analysierten Röntgenkristallstruktur weiter erforscht werden.

Ein weiteres Projekt stellte die Untersuchung der Regulation durch prädiabetische Signale dar. Hierbei sollte ergänzend zu den Arbeiten von Manuel Wallbach, welcher im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit zwei funktionelle Kernerkennungssequenzen (NLS, *engl. nuclear localization sequence*) in der DLK identifizierte, ein Kernexportsignal (NES, *engl. nuclear export signal*) identifiziert und auf Funktionalität untersucht werden. Dahingehend sollte die Bedeutung der proinflammatorischen Cytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL1-}\beta$ für die nukleäre Lokalisation der DLK ergründet und zudem gezeigt werden, inwieweit die Kernlokalisierung dieser Kinase erforderlich ist, um β -Zellapoptose zu induzieren.

Da das konstitutive Ausschalten der DLK in Mäusen zum perinatalen Tod führt, ergab sich das weitere Forschungsvorhaben, β -zellspezifisch DLK defiziente Mäuse zu generieren und zu charakterisieren. Mit diesen transgenen Mäusen soll in Zukunft die Bedeutung der DLK für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 *in vivo* untersucht werden.

Die Ergebnisse des hier vorgelegten Projektes können durch ein besseres Verständnis für die Regulation der DLK in der Zukunft dazu beitragen, die Dual Leucine-Zipper Kinase als neues therapeutisches Ziel für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	H: 225, 319, 336 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar, bakteriologisch	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, Standard	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	H: 272, 302, 315, 317, 319, 334, 335 P: 261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (Natriumsalz)	H: 317, 334 P: 261, 280, 342+311	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amylose Resin (Amylose-Harz)	H: / P: /	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Bis-Acrylamid 37.5:1 30%	H: 302, 312, 315, 319, 317, 340, 350, 361, 372 P: 260, 280, 281, 305+351+338, 405, 501	Bio-Rad, München, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Bradford Protein Assay	H: 226, 332, 314, 370 P: 210, 303, 361+353, 305+351+338, 310, 405, 501	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Bromophenolblau	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	H: 319 P: 305+351+388	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
cOmplete®, Mini, EDTA-frei Proteaseinhibitor Cocktail	H: 315, 319 P: 264, 280, 302+352, 332+313, 337+313, 362+364	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Coomassie®-Brilliant-Blau G250	H: / P: /	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ciclosporin (CsA)	H: 302, 350, 360 P: 201, 308+313	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytosine β-D-arabino-furanoside (ara-C)	H: 317, 361 P: 280	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deoxycholsäure (Natriumsalz)	H: 302 P: 301+312, 330	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	H: 302, 315, 319, 412 P: 264, 270, 273, 280, 337+313, 501	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

MATERIAL UND METHODEN

DNA loading dye (6x)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP Mix, 10 mmol/L	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
(DPBS) ohne Calcium and Magnesium	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Draq5	H: 315, 319, 335 P: 302+352, 305+351+338, 304+340, 332+313, 337+313, 261	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Eisessig	H: 226, 290, 314 P: 210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolut	H : 225, 319 P: 210, 240, 305+351+338, 403+233	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	H: 331, 341 P: 261, 280, 304+340, 311, 403+233	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	H: 319 P: 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS) Biochrom Superior	H: / P: /	Merck, Darmstadt, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Formaldehyd 37%	H: 301+311+331, 314, 317, 335, 341, 350, 370 P: 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 308, 310	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Forskolin	H: 312 P: 280	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D(+)-Glukose wasserfrei	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Glutaraldehyd 25%	H: 301, 330, 314, 317, 334, 335, 400, 411 P: 260, 280, 304+340, 310, 305+351+338, 403+233	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerol	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycylglycin	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
His-Bind® Resin, Ni ²⁺ -charged	H: / P: /	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	H: 302, 315, 319 P: 280, 302+352, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Imidazol	H: 360D, 302, 314 P: 201, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	SERVA Heidelberg, Deutschland
Kaliumacetat	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	H: / P: /	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kohlendioxid (CO ₂)	H: 280 P: 202, 261, 262, 280.3, 410+403,	TMG, Krefeld, Deutschland
Kollagenase NB 8 Broad Range aus Clostridium histolyticum	H: 315, 317, 319, 334, 335 P: 280, 302+352	SERVA Heidelberg, Deutschland
Lambda DNA	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
D-Luciferin (Kaliumsalz)	H: / P: /	Promega, Mannheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Magnesiumchlorid Hexahydrate
($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) H: /
P: / Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) H: /
P: / Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

D-Maltose H: /
P: / SERVA
Heidelberg,
Deutschland

Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat
($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$) H: 302, 318, 373, 411
P: 273, 280, 301+312,
330, 305+351+338, 310,
391, 501 Sigma-Aldrich,
St. Louis, MO,
USA

2-Mercaptoethanol H: 301+331, 310, 315,
317, 318, 373, 410
P: 270, 280, 302+352,
330, 304+340,
305+351+338, 310 Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

Metafectene® PRO H: /
P: / Biontex,
München,
Deutschland

Methanol H: 225, 301+311+331,
370
P: 210, 240, 280,
302+352, 304+340, 308,
310, 403+233 VWR
International,
Darmstadt,
Deutschland

Milchpulver H: /
P: / Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

Natriumchlorid (NaCl) H: /
P: / Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS) H: 228, 302+332, 315,
318, 335, 412
P: 210, 261, 280,
302+352, 305+351+338,
312 Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) H: /
P: / Carl Roth,
Karlsruhe,
Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	H: / P: /	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Lösung 1 mol/L (NaOH)	H: 314 P: 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet™ P-40 (NP40)	H: 302, 318, 411 P: 280, 301+312, 305+351+338	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	H: 228, 302, 332, 351, 335, 315, 319, 317 P: 281, 302+352, 305+351+338, 308+313, 304+340	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/10 mg/mL)	H: 317, 334, 360, 371 P: 302+352, 304+340, 201, 260, 333+313, 261	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pferdeserum	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	H: 301, 314 P: 280, 305, 351+338, 310	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PhosSTOP® Phosphataseinhibitor	H: 302 P: 264, 270, 301+312, 330, 501	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Ponceau 2R	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Propanol (Isopropanol)	H: 225, 319, 336 P: 210, 261, 305+351+338	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Puffer	H: 290 P: 390, 234	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

MATERIAL UND METHODEN

RNase A (10 µg/mL)	H: / P: /	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Roti®-Histofix 4%	H: 302, 317, 341, 350 P: 261, 280, 302+352, 308+313	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokitt II	H: 226, 302+332, 304, 315, 319, 335, 373 P: 210, 260, 280, 301+310, 303+361+353	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare DAPI	H: 300, 400, 410 P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	H: / P: /	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure (HCl) 1 mol/L	H: 290 P: /	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%	H: 290, 314, 335 P: 260, 280, 303+361, 353, 304+340+310, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig (N ₂)	H: 281 P: 282, 336+315, 403	TMG, Krefeld, Deutschland
Tacrolimus (FK506) Monohydrat	H: 301 P: 301+310	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylen-diamin (TEMED)	H: 225, 332, 302, 314 P: 210, 233, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308, 310	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS- Hydrochlorid (Tris-HCl)	H: 315, 319, 335 P: 280, 302+352, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Triton X-100	H: 302, 318, 411 P: 273, 280, 305+351+338	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma® base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin 1360 USP U/mg	H: 315, 319, 334, 335 P: 302+352, 305+351+338, 304+341, 342+311	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung 10X 0.5% trypsin, 0.2% EDTA	H: / P: /	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton/Pepton aus Casein	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α)	H: / P: /	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tween® 20	H: / P: /	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	H: 271, 302, 314, 332, 335, 412 P: 210, 220, 260, 280, 305+351+338, 370+378	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	H: 226, 332, 312, 315 P: 302+352	Th. Geyer, Renningen, Deutschland

2.1.2 Geräte

Analysenwaage Sartorius laboratory BP 610	Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Sartorius laboratory MC 210 P	Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Autoklav EVO 120	Mediatech, Henstedt-Ulzburg, Deutschland
Bakterieninkubator Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine	Hoshizaki, Amsterdam, Netherlands
Fluorometer, FluoroCount Microplate, halogene Lichtquelle, 485 nm, 530 nm	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Kryotec, Hamburg, Deutschland
Schüttler GFL 3006	GFL Gesellschaft für Labor- technik, Burgwedel, Deutschland
Horizontale Elektrophoresekammer (40-0911)	PeqLab Technologies, Erlangen, Deutschland
Horizontale Elektrophoresekammer (40-1214)	PeqLab Technologies, Erlangen, Deutschland
ImageQuant® LAS 4000 Luminescent Image Analyzer System	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Kamera Canon EOS (Für Agarosegele)	Canon, Präfektur Tokio, Japan
Kryostat LEICA CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Mikroskop Konfokal Axio Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Mikroskop Konfokal Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Mini PROTEAN® System Glasplatten	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini PROTEAN® System 10-well Kamm	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini PROTEAN® System 15-well Kamm	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini PROTEAN® Tetra cell	BioRad Laboratories, München, Deutschland
PH-Meter FiveEasy pH FE20	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Photometer Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Reference 2	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Pipettierhilfe S1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reagenzglasschüttler Reax control	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schüttelinkubator Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Spannungsgerät Bio Rad PowerPac® basic	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Sterile Werkbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer comfort 1,5 mL Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tube Roller RS-TR05 analog	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Ultraschallgerät BANDELIN Sonopuls UW 2200	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
Überkopf-Rotator, Heidolph RZR1	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
UV-Platte (312 nm)	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vakuumpumpe VacuGene®	Pharmacia fine chemicals, Piscataway, NJ, USA
Wasserbäder	GFT, Burgwedel, Deutschland Julabo, Seelbach, Deutschland
Wassersystem Ultra-pure Milli-Q	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zellinkubator Heraeus Heracell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Eppendorf 5424R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Zentrifuge Rotina 35R

Hetterich,
Tuttlingen, Deutschland

2.1.3 Software

EduPyMOL Molecular Graphics System

Schrödinger Inc,
New York, USA

GraphPad Prism 5

GraphPad Software, Inc.,
La Jolla, CA 92037 USA

Image J®

National Institute of Health,
USA

Image Lab™ Software

BioRad Laboratories,
München, Deutschland

Image Studio™ Lite

LI-COR Biotechnology,
Bad Homburg, Deutschland

Microsoft Office (Excel, Power Point, Word)

Microsoft,
Redmond, USA

Quantity One® 1-D analysis software

BioRad Laboratories,
München, Deutschland

SnapGene® Viewer

GSL Biotech LLC,
Chicago, USA

Vector NTI Advance® 11.5.3

Thermo Fisher Scientific,
Waltham, MA, USA

ZEN 2 blue edition

Carl Zeiss Microscopy,
Jena, Deutschland

ZEN 2009 light edition

Carl Zeiss Microscopy,
Jena, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

10 cm Agar-Platte

Greiner Bio One,
Frickenhausen, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

96-well Platte, schwarz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
96-well Platte, weiß	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Cellstar 6-well Zellkulturplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar 12-well Zellkulturplatte	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tube 15 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tube 50 mL	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen (Tissue Culture Coverslips Ø 13 mm, Plastik)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Dialyseschläuche	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,2 mL, 0,5 mL/ 1,5 mL/ 2,0 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gel-Ladespitzen, Multiflex® 1-200 µL	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Glasware	Brand, Wertheim, Deutschland Schott, Mainz, Deutschland
Handschuhe, Nitril	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kanülen (20 G / 27 G/ 30 G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Kunststoffküvetten 1 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Millex®-GV Spritzengetriebene Filtereinheit 0,22 µm	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Objektträger, gekammert (4 Chambered coverglass system) Lab-Tek™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Objektträger SuperFrost/Plus 75 x 25 mm	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Parafilm	American National Can™, Greenwich, CA, USA
Pipettenspitzen 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 2 mL, 5 mL	Braun, Melsungen, Deutschland
Whatmanpapier (Filterpapier)	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Zellkulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 6 cm / 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellophan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellschraber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland

Zählkammer Neubauer
0,100 mm; 0,0025 mm²

Marienfeld Superior,
Lauda Königshofen ,
Deutschland

2.1.5 Kits

Amersham® ECL® Western
Blotting Analysis System

H: /
P: /

GE Healthcare,
Little Chalfont, UK

Fast Digest Restriktionsenzyme:
BamHI, HindIII, NdeI, Sall, XhoI

H: /
P: /

Thermo Scientific,
Waltham, MA, USA

FastGene Gel/PCR Extraction Kit

R: 20+21+22, 34,
52+53
S: 1+2, 13, 25, 26,
27+28, 36+37+39,
45, 61, 64

Nippon Genetics
Europe
Dueren, Deutschland

Genopure® Plasmid Maxi Kit

H: 225, 290, 315, 319
P: 210, 233,
362+364, 370+378

Roche Diagnostics,
Mannheim,
Deutschland

High Pure® Plasmid Isolation Kit

H: 302+332, 315, 319
P: 261, 280, 362+364

Roche Diagnostics,
Mannheim,
Deutschland

KAPA® Mouse Genotyping Hot
Start Kit

H: 301, 370
P: 270, 264, 310,
312, 330

KAPA Biosystems,
Wilmington, MA, USA

Phusion DNA Polymerase

H: /
P: /

Thermo Scientific,
Waltham, MA, USA

Restriktionsenzyme:
BamHI, Eco91I (BstEII), EcoRI,
HindIII, NdeI, Sall, XhoI

H: /
P: /

Thermo Scientific,
Waltham, MA, USA

Restriktionsenzyme:
BbvCI, BstEII

H: /
P: /

NEB,
Frankfurt am Main,
Deutschland

2.1.6 Antikörper

Name	Verwendung	Spezies	Klon	Herkunft
Primäre Antikörper				
Anti-His ₆	WB: 1:650	Maus	Monoklonal	Cusabio
Anti-Flag® M2	IF: 1:200; 1:2000	Maus	Monoklonal	Sigma-Aldrich
β-Galactosidase	DAB: 1:100	Kaninchen	Polyklonal	Invitrogen
c-Jun	WB: 1:1000	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling Technology
Cleaved Caspase-3 (Asp 175)	IF 1:50	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology
DLK (223 C-terminale AS)	DAB, IF: 1:50 WB: 1:3000	Kaninchen	Polyklonal	Holzmann et al., 1994 Fan et al., 1996
GAPDH	WB: 1:60000	Maus	Monoklonal	Santa Cruz
GFP (für YFP)	IF: 1:500	Kaninchen	Polyklonal	Abcam
Glucagon	IF: 1:200	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology
Insulin	DAB, IF: 1:50	Maus	Monoklonal	Sigma-Aldrich
Insulin	IF: 1:50	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling Technology
MBP	WB: 1:20000	Maus	Monoklonal	New England Biolabs
P38	WB: 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-DLK (Ser302)	WB: 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	AG Oetjen (immune Globe)
Phospho-c-Jun (Ser 73)	WB: 1:1000	Kaninchen	Monoklonal	Cell Signaling Technology

MATERIAL UND METHODEN

Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	WB: 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-P38 (Thr180/Tyr182)	WB: 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology
SAPK/JNK	WB: 1:1000	Kaninchen	Polyklonal	Cell Signaling Technology

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor® 488- labeled Anti-Maus	IF: 1:50	Ziege	Polyklonal	Invitrogen
Peroxidase-labeled Anti-Maus	DAB: 1:50 WB: 1:20000	Schaf	Polyklonal	Dianova
Peroxidase-labeled Anti-Rabbit	DAB: 1:50 WB: 1:20000	Ziege	Polyklonal	Dianova
Tetramethylrhodami ne (TRITC)- labeled Anti-Maus	IF: 1:200; 1:50	Ziege	Polyklonal	Invitrogen

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Expressionsplasmide

Name	Herkunft	Referenz
pcDNA3.1-FLAG-DLK wt*	Mus musculus	Holzman et al., 1994
pcDNA3.1-FLAG-DLK K185A*	Mus musculus	Mata et al., 1996
pcDNA3.1-FLAG-DLK NLS1*	Mus musculus	Wallbach et al., 2016
pcDNA3.1-FLAG-DLK NLS1*	Mus musculus	Wallbach et al., 2016
pcDNA3.1-FLAG-DLK NES*	Mus musculus	Wallbach et al., 2016
pcDNA3.1-FLAG-DLK CN1* (M275R/I277K)	Mus musculus	Diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

pcDNA3.1-FLAG-DLK CN2* (L362A/V364A)	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK CND* (M275R/I277K) / (L362A/V364A)	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK L362A*	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK L362R*	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK V364A*	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK W334A*	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK Y343A*	Mus musculus	Diese Arbeit
pcDNA3.1-FLAG-DLK Y343F*	Mus musculus	Diese Arbeit
pMAL-c2x-MBP (140-517aa)		Rohollah Babaeikelishomi (Dissertation)
pMAL-c2x-MBP-DLK wt (140-517aa)	Mus musculus	Rohollah Babaeikelishomi (Dissertation)
pMAL-c2x-MBP-TEV-DLK wt (140-517aa)	Mus musculus	Diese Arbeit
pMAL-c2x-MBP-TEV-DLK L362A (140-517aa)	Mus musculus	Diese Arbeit
pMAL-c2x-MBP-TEV-DLK V364A (140-517aa)	Mus musculus	Diese Arbeit
pMAL-c2x-MBP-TEV-DLK L362A/V364A (140-517aa)	Mus musculus	Diese Arbeit
pET15b-p11-CNA ₁₋₃₉₁ /CNB ₁₋₁₇₀	Homo sapiens	Grigoriu et al., 2013
Gal4-c-Jun		AG Oetjen

Gal4-CREB (CRG)*

Oetjen et al., 2005

pBluescript (BS)

Leervektor

Invitrogen, Karlsruhe, Germany

*volle Länge des Proteins

2.1.7.2 Reportergenplasmide

Name	Promotor	Referenz
4xSomCRE-Luc	Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase (HSV-TK)	Oetjen et al., 1994
c-fos-Luc	c-fos (Homo sapiens)	Oetjen et al., 2007
pG5E1BLuc	E1B Adenovirus	Oetjen et al., 2005
pGFP-Mutante topaz gold (pGFPtpz)	CMV	Canberra-Packard, Dreieich, Germany

2.1.8 DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker

Die DNA- und Proteinmolekulargewichtsmarker wurden von Fermentas Life Sciences (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bezogen.

Für die DNA-Analyse auf Agarosegelen:

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder

Für die Proteinanalyse auf SDS-PAGE:

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 kDa - 170 kDa)

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 kDa - 250 kDa)

2.1.9 Biologisches Material

2.1.9.1 Bakterienstämme

One Shot® Stbl3™ chemisch kompetente apathogene Escherichia Coli (E.coli) wurden zur Plasmid-Amplifikation und zur Expression rekombinanter MBP-Fusionsproteine verwendet. One Shot® BL21(DE3) chemisch kompetente apathogene Escherichia Coli wurden ausschließlich für die Expression vom rekombinanten His-markierten Calcineurin genutzt.

2.1.9.1.a Medien

LB-Medium/LB-Amp-Medium

Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
NaCl	0,5% (w/v)	5 g
Pepton	1% (w/v)	10 g
dH ₂ O		ad 1 L
Ampicillin	50 µg/mL	

SOB-Medium

Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
NaCl	0,05% (w/v)	0,5 g
Pepton	2% (w/v)	20 g
dH ₂ O		ad 1 L

SOC-Medium*

Glukose (steril filtriert)	2% (v/v)	20 mL (1 M Lösung)
SOB-Medium		ad 1 L

*Vor Gebrauch eine MgCl₂-Lösung (2 M) hinzugeben (Endkonzentration 5 µL/mL).

Transformationpuffer

KCl	250 mM	18,65 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	55 mM	10,88 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	15 mM	2,20 g
PIPES (pH 6,7)	10 mM	20 mL (0,5 M PIPES)
dH ₂ O		ad 1 L

Alle Medien wurden autoklaviert (121 °C, 20 min) und bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde dem LB-Medium das Antibiotikum frisch hinzugegeben (LB-Amp-Medium).

Je nach Experiment wurde ein bestimmtes Volumen an LB-Amp-Medium verwendet, mit den Bakterien (z.B. aus einem Glycerol-Stock oder eine Kolonie auf der LB-Amp-Agarplate) geimpft und auf einer Schüttelplattform bei 220 U/min bei 30 °C - 37 °C geschüttelt.

Zur Herstellung von LB-Amp-Agarplatten wurde LB-Medium hergestellt und 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Die Lösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und auf etwa 50 °C abgekühlt. Anschließend wurde Ampicillin (50 µg/mL) hinzugegeben und in 10 cm Schalen gegossen. Die Agarplatten wurden bei 4 °C für max. 3 Monate gelagert.

2.1.9.1.b Herstellung chemisch kompetenter E.Coli

One Shot® Stbl3™ und One Shot® BL21 (DE3) wurden nach der Inoue-Methode (Inoue et al., 1990) hergestellt. Dazu wurden 2 µL der Zellen in 25 mL SOB-Medium überführt und für 6 - 8 h auf einer Schüttelplattform bei 220 U/min und 37 °C inkubiert. 2 - 8 mL dieser Vorkultur wurden am späten Abend in 250 mL SOB-Medium angeimpft und bei Raumtemperatur und 220 U/min über Nacht bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Übernachtkultur für 10 min in einem Eiswasserbad gekühlt und bei 4 °C und 3.000 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 mL eiskalten Transformationspuffer erneut suspendiert und 7% (1,5 mL) DMSO hinzugegeben. Nach 10 min wurde die Suspension in vorgekühlten autoklavierten 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen (auf Trockeneis gestellt) aliquotiert. Die 100 µL Aliquots wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.9.2 Zelllinien

2.1.9.2.a Puffer

Trypsin/EDTA-Lösung 1x

Trypsin/EDTA 10x	1 mL
DPBS 1x	ad 10 mL

2.1.9.2.b HIT-T15 Zellen

Hamster-Insulinoma-Tumorzellen (HIT Zellen) sind eine insulinproduzierende pankreatische β -Zelllinie, welche durch die Transformation von β -Zellen des syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) mit dem Simian-Virus-40 T15-Antigen (SV40 T-15) gefolgt von einer seriellen Klonierung hergestellt wurden (Santerre et al., 1981). Die HIT-T15 Zellen zeigen eine glukosestimulierte Insulinsekretion, weisen eine Reihe physiologischer Eigenschaften der normalen Hamster- β -Zellen auf und sind elektrisch erregbar.

Für die meisten Experimente dieser Arbeit wurden HIT-T15 Zellen verwendet.

2.1.9.2.b.I Medien, Kultur und Langzeitkonservierung

RPMI-Komplettmedium 500 mL

RPMI Medium 1640		420 mL
Fetales Kälberserum	10% (v/v)	50 mL
Pferdeserum	5% (v/v)	25 mL
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	5 mL

Im flüssigen Stickstoff eingefrorene (1 mL) HIT-T15 Zellen wurde bei 37 °C aufgetaut und in Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Life Invitrogen) 1640-Komplettmedium (RPMI-Komplettmedium) in 15 cm Zellkulturplatten bei 37 °C, 95% Feuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden einmal pro Woche bei voller Konfluenz mit sterilem 1X DPBS gewaschen und mit 3 mL 1x Trypsin/EDTA (5 min bei 37 °C) vom Zellkulturplattenboden gelöst. Nach dieser Zeit wurde der Verdau durch Zugabe von 7 mL RPMI-Komplettmedium gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren von der Schale vollständig aufgenommen. Die Zellen wurden bei 850 U/min für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. HIT-Zellen wurden erneut mit RPMI-Komplettmedium suspendiert, ein Aliquot in einer Zählkammer gezählt und je nach Experiment mit einer Dichte von 10000 bis 2 Mio. Zellen/cm² in 6- oder 12-well-Zellkulturplatten ausgesät. Um die Zellen in Kultur zu halten, wurden andere 15 cm Zellkulturplatten je nach Dichte in weitere 15 cm Zellkulturplatten einmal wöchentlich

gesplittet (1:2 bis 1:4). Hierbei wurde das RPMI-Komplettmedium alle 3 - 4 Tage gewechselt.

Zur Langzeitkonservierung wurden HIT-T15 Zellen in RPMI-Komplettmedium (mit 10% DMSO) aufgenommen und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff (flüssige Stickstoffdampfphase) eingefroren.

2.1.9.2.c JEG-3 Zellen

Die JEG-3 menschlichen Chorion-Karzinom-Tumorzellen (Kohler und Bridson, 1971) sind hormonproduzierende Zellen, welche unter Anderem humanes Chorion-Gonadotropin hCG, humanes Plazenta-Laktogen und Progesteron sezernieren (Chou, 1982).

JEG-3 Zellen wurden wie die HIT-T15 Zellen für transienten Transfektionen zum Zweck der Proteinanalyse, Reporter-gen-Assays und Immuncytochemie verwendet.

2.1.9.2.c.I Medien, Kultur und Langzeitkonservierung

DMEM-Komplettmedium 500 mL

DMEM Medium		445 mL
Fetales Kälberserum	10% (v/v)	50 mL
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)	5 mL

JEG-3 Zellen wurden unter denselben Bedingungen wie die HIT-T15 Zellen inkubiert und behandelt. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose, supplementiert mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (DMEM-Komplettmedium) aufgenommen und kultiviert. Die JEG-Zellen wurden zweimal wöchentlich zu 1:7 oder 1:8 gesplittet und zwei- bis dreimal das DMEM-Komplettmedium gewechselt.

Zur Langzeitkonservierung wurden die JEG-3 Zellen in DMEM-Komplettmedium (mit 5% DMSO) aufgenommen und im flüssigen Stickstoff (flüssige Stickstoffdampfphase) eingefroren.

2.1.9.3 Tiermodell

Die Generierung und Charakterisierung der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse erfolgte nach den geltenden Richtlinien des „Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz“ für Pflege und Nutzung von Versuchstieren. Die Mäuse wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet hatten in Makrolon®-Käfigen freien Zugang zu Wasser und Standard-Futter (Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Alle Tiere wurden bei 20 ± 2 ° C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 bis 65% sowie bei einem Tag-Nacht-Regime von 12 h (Lichtphase 06:00 Uhr bis 18:00 Uhr) gehalten. Die Tierversuche wurden unter den Genehmigungsnummern G11/062_Cafeteria und ORG_721_Inseln bei der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg geführt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA orientierte Experimente

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist in der Biochemie und Molekularbiologie das einfachste und effektivste Verfahren zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer molekularen Größe. Hierbei fungiert das Agarosegel als Sieb, dessen Poren den DNA-Fragmenten nach Anlegen eines elektrischen Feldes einen Widerstand bieten. Durch diese Eigenschaft wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als größere Fragmente, welche stärker durch die Siebstruktur retiniert werden. Die Größe des Fragmentes bestimmt den Prozentsatz (w/v) des herzustellenden Agarosegels.

Je nach der aufzutrennenden Fragment-Größe wurde die Agarosemenge für ein 0,8% - 1,2% Gel gewogen und die entsprechende Menge TAE-Elektrophorese-Puffer hinzugegeben. Die Agarose wurde bis zur klaren homogenen Lösung in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf etwa 50 °C kurz abgekühlt. Der noch flüssigen Agarose-TAE-Lösung wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/mL}$ hinzugefügt und in die passende Gießkammer gegossen. Diese Gelkammer

verfügt über einen Kamm, um die passende Anzahl der zu bestimmenden DNA-Proben herzustellen. Das Gel polymerisiert je nach Agarosekonzentration für 10 - 30 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde das abgekühlte Gel in die passende Elektrophorese-Kammer gelegt, mit TAE-Puffer bedeckt und der Kamm wurde entfernt.

Die DNA-Proben wurden mit einer Beschwerer(+Farbe)-Lösung (6x DNA *Loading Dye*, Fermentas, St. Leon-Rot; Endkonzentration 1x) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. 5µL eines DNA-Molekulargewichtsmarkers (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder für Fragmente von 250-10000 bp sowie der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder für Fragmente von 80-1000 bp) wurden ebenfalls aufgetragen.

Die anzulegende Spannung zum Erzeugen eines elektrischen Feldes sowie die Dauer der Elektrophorese wurden je nach der Größe der erwarteten Banden gewählt.

Im Anschluss wurden die DNA-Banden mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm identifiziert und wenn erwünscht ausgeschnitten und aufgereinigt (Kapitel 2.2.1.2).

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer 1x

Tris-Base	40 mM	4,84 g
Eisessig	20 mM	1,14 mL
EDTA	1 mM	2,00 mL (0,5 M Stammlösung)
dH ₂ O		ad 1 L

Tris-EDTA (TE)-Puffer (pH 8,0)

Tris-Base	10 mM	1,21 g
EDTA	1 mM	2,00 mL (0,5 M Stammlösung)
dH ₂ O		ad 1 L

2.2.1.2 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Die nach der Gel-Elektrophorese identifizierten Fragmente wurden zügig unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm (EtBr-Fluoreszenz) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

Die Isolierung der DNA erfolgte anschließend mittels DNA Purifikation Kits in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemäß den Angaben des Herstellers. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde der Elution-Puffer oder TE-Puffer (30 µL) auf 70 °C vorgewärmt.

2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit

2.2.1.3.a Photometrische Bestimmung

Konzentration und Reinheit der aufgereinigten DNA können über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ($OD_{260\text{ nm}}$) ermittelt werden. Diese Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz und dient der Berechnung der Konzentration einer Lösung anhand der Absorption monochromatischen Lichtes. Da die optische Dichte von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm ($OD_{280\text{ nm}}$) erfassbar ist (Absorptionsmaximum der Proteine), gibt das Verhältnis der $OD_{260}/280$ Aufschluss über die Reinheit der DNA. Eine proteinfreie homogene DNA-Lösung soll demnach ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 aufweisen (Sambrook et al., 1989).

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in einer homogenen Lösung ergibt aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgender Zusammenhang:

$$c(DNA) \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] = OD_{260\text{ nm}} [1] * \text{Verdünnungsfaktor} [1] * 0,05 \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right]$$

Die Absorption einer 50 µg/mL Lösung doppelsträngiger DNA bei 260 nm in einer 1 cm-Quarzküvette beträgt 1,0 (Sambrook et al., 1989). Da die Sichtdicke d der Quarzküvette 1 cm ist, kann diese rechnerisch vernachlässigt werden.

Der Multiplikationsfaktor für DNA entspricht 50 (µg/mL). Für RNA, einzelsträngige DNA und Oligonukleotide werden jeweils die Multiplikationsfaktoren 40, 33 und 20 µg/mL verwendet.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nicht für alle denkbaren Konzentrationen einer Lösung. Der lineare Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration muss im Einzelfall empirisch ermittelt werden.

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mithilfe eines UV-Vis-Spektralphotometers (Nanodrop™) bestimmt. 1 µL der DNA-Lösung wurde gegen 1 µL des verwendeten reinen Puffers zur DNA-Extraktion (meistens TE-Puffer) gemessen.

Der lineare Bereich zur Messung der Konzentration einer DNA-Lösung wurde für den verwendeten Nanodrop™ 1000 wie folgt empirisch ermittelt (Abbildung 2.1).

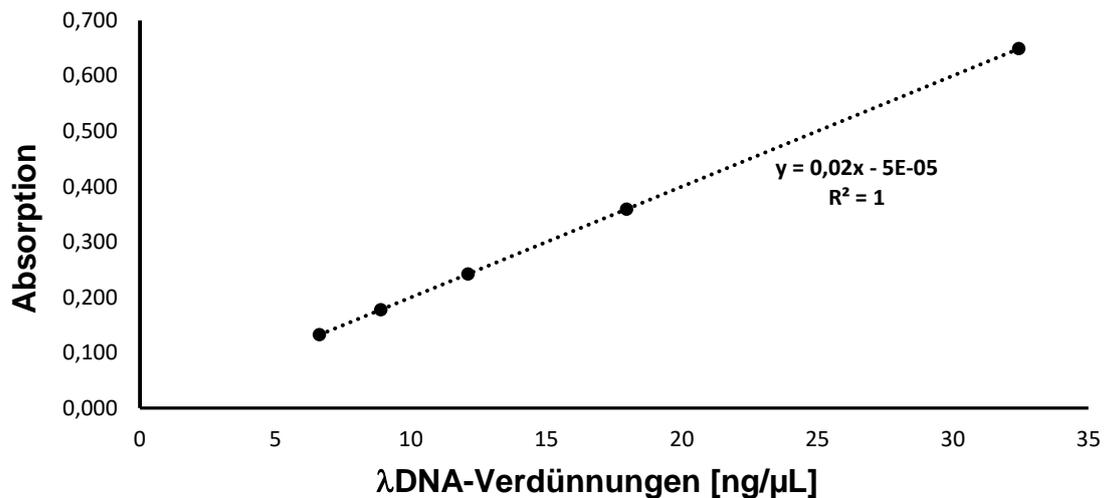


Abbildung 2.1: Kalibrierung der Absorption / c (DNA) [y,x]. Aufgetragen wurden die Mittelwerte der gemessenen λDNA-Verdünnungen gegen die Mittelwerte der gemessenen Absorption [y-Achse]. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Lambda-DNA (λDNA, 0,3µg/µL, Fermentas) hergestellt (1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30). 1 µL jeder Lösung wurde drei Mal gemessen und der jeweilige Mittelwert gebildet. Aus der obigen Regressionsgerade ergibt sich ein linearer Bereich für das Absorptionsintervall 0,08 - 0,8 [1].

2.2.1.3.b Abschätzung der DNA-Konzentration mittels Agarosegel

Zur besseren Einschätzung bzw. Verifizierung der mittels Nanodrop™ ermittelten DNA-Konzentrationen wurden 25 - 70 ng DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der Bandenintensität nach der Gel-Elektrophorese wurde die DNA-Lösung mit bekannten DNA-Mengen (DNA- Molekulargewichtsmarker oder λDNA) verglichen und mithilfe der Auswertungssoftware *Image Studio™ Lite* quantifiziert (Abbildung 2.2). Dieses Verfahren ermöglicht Verunreinigungen mit DNA-Fragmenten anderer Größe auszuschließen, wodurch die Effizienz der DNA-Ligation steigt.

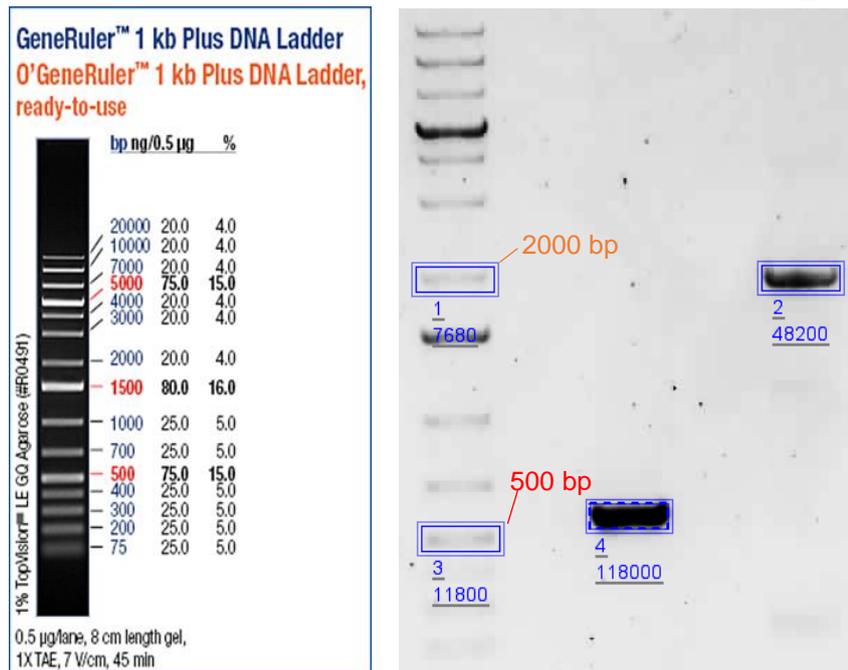


Abbildung 2.2: Repräsentative Darstellung zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen aus einem Agarosegel mithilfe eines DNA-Größenmarkers. Der DNA-Molekulargewichtsmarker (links) liefert die DNA-Referenzgröße und die DNA-Menge zur Auswertung. Ein typisches Agarosegel (rechts) liefert die DNA-Referenzgröße und die DNA-Menge zur Auswertung. Ein typisches Agarosegel (rechts) mit zwei Proben (A,B) zur quantitativen Bestimmung. Als Referenzbanden werden 1 (2000 bp) und 3 (500 bp) verwendet. M = 5 µL DNA-Molekulargewichtsmarker; A = 5 µL Fragment A; B = 5 µL Fragment B. Die Zahlen auf dem Agarosegel (in blau) stehen für die Bandenintensitäten (Bande 1 = 7680; Bande 2 = 48200; Bande 3 = 11800; Bande 4 = 118000).

5 µL des DNA-Molekulargewichtsmarkers entsprechen 0,5 µg Gesamt-DNA. Es wurde eine von der Größe des Fragmentes ähnliche Bande des DNA-Molekulargewichtsmarkers als Referenz für die Masse genommen. Die Intensitäten der zu untersuchenden Banden wurden in der obigen Abbildung mittels *Image Studio™ Lite* quantifiziert und in Relation zur jeweiligen Referenzbande gesetzt. Diese berechneten DNA-Konzentrationen wurden mit den mit Nanodrop™ ermittelten DNA-Konzentrationen verglichen. Bei großen Abweichungen wurde die mittels Agarosegel berechnete Konzentration gewählt.

2.2.1.4 Restriktionsenzymverdau

Ein Restriktionsenzymverdau ist eine molekularbiologische Methode zur Verifizierung der Identität von DNA bekannter Sequenz, zum Vergleich der Identität zweier

DNA-Proben anhand der entstehenden charakteristischen Fragmente sowie zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten zur Klonierung.

2 - 4 µg Plasmid DNA wurden zum Schneiden und zur Aufreinigung des Vektors eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte mit 2 Units/1µg DNA (1 - 2 µL) je Restriktionsenzym. Im Allgemeinen wurden *Fast Digest* Enzyme verwendet und der Reaktionsmix für 12 min bei 37 °C inkubiert. Der gesamte verdaute Ansatz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das Vektor-Fragment ausgeschnitten, aufgereinigt und dephosphoryliert (Kapitel 2.2.1.5).

PCR-Fragmente wurden nach der DNA-Aufreinigung ebenfalls verdaut, um die passenden Enden zur Ligation zu erzeugen. Der Verdau von PCR-Fragmenten fand über Nacht statt, um die Effizienz der Reaktion für terminale kurze Erkennungssequenzen zu erhöhen. Hierfür wurden klassische Restriktionsenzyme (Thermo Scientific, NEB) und die dazugehörigen Reaktionspuffer verwendet.

Dem aufgereinigten PCR-Fragment (30 µL) wurden 2 Units (1 µL) je Restriktionsenzym, das entsprechende Volumen an 10x Puffer hinzugegeben und mit dH₂O auf 40 µL aufgefüllt. Am folgenden Tag wurde der gesamte Fragment-Ansatz nach Agarose-Gelelektrophorese ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Ligation eingesetzt (Kapitel 2.2.1.6). Zur schnellen Identifizierung nach der DNA-Minipräparation kamen ebenfalls *Fast Digest* Enzyme zum Einsatz.

Typischer Restriktionsenzymverdau (Fragment DNA)

Fragment DNA	30,0 µL (nach DNA-Gel-Extraktion)
Puffer (10x)	4,0 µL
Restriktionsenzym 1	1,0 µL
Restriktionsenzym 2	1,0 µL
dH ₂ O	ad 40,0 µL

Typischer Restriktionsenzymverdau (Vektor DNA)

Vektor DNA (Plasmid)	xxx µL (2 µg - 4µg)
<i>Fast Digest Green Buffer</i> (10x)	2,0 µL
Restriktionsenzym 1	1,0 - 2,0 µL
Restriktionsenzym 2	1,0 - 2,0 µL
dH ₂ O	ad 20,0 µL

Typischer Restriktionsenzymverdau (Screening)

Plasmid DNA (Minipräp)	16,0 µL (0,5 µg - 2 µg)
<i>Fast Digest Green Buffer</i> (10x)	2,0 µL
Restriktionsenzym 1	1,0 µL
Restriktionsenzym 2	1,0 µL

2.2.1.5 DNA-Dephosphorylierung des 5'-Endes

Für die mit Restriktionsendonukleasen linearisierten Plasmide, deren Enden identische Restriktionsschnittstellen besitzen, erfolgte die Dephosphorylierung am 5'-Ende mittels der *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP).

Der nach dem Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigte linearisierte Vektor wurde mittels Nanodrop™ quantifiziert. Für den Dephosphorylierungsschritt wurden der in TE-Puffer aufgenommenen Menge an Vektor (ca. 30 µL) 4 µL des 10x CIAP-Reaktionspuffers und 2 µL (2 Units) der alkalischen Phosphatase (FastAP) hinzugegeben und auf 40 µL mit dH₂O aufgefüllt. Der Reaktionsmix (1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß) wurde bei 37 °C für 10 min in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch fünfminütiges Erhitzen bei 75 °C inaktiviert. Eine weitere Aufreinigung der dephosphorylierten Vektor-DNA war nicht mehr erforderlich. Die mittels Nanodrop™ gemessene Konzentration in 30 µL muss nach der Reaktion auf 40 µL Endvolumen angepasst werden (Verdünnungsschritt).

Typischer Dephosphorylierung-Ansatz

Vektor-DNA	30,0 µL (nach DNA-Gel-Extraktion)
CIAP-Reaktionspuffer (10x)	4,0 µL
FastAP	2,0 µL
dH ₂ O	ad 40,0 µL

2.2.1.6 DNA-Ligation

Das mittels Restriktionsenzymen an den 3' und 5'-Enden geschnittene PCR-Fragment wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen, die erwartete Bande ausgeschnitten und mithilfe eines Gel/PCR-Extraktionskits aufgereinigt.

Der zu verwendende Vektor wurde nach Linearisierung mit Restriktionsenzymen und nach Aufreinigung mit dem Gel/PCR-Extraktionskit an seinem freien 5'-Phosphatende dephosphoryliert, um die Religation zu verhindern (Kapitel 2.2.1.5).

Die jeweilige DNA-Menge wurde mittels Nanodrop™ und halbquantitativ auf einem Agarosegel ermittelt. Hierbei ist auf die DNA-Messung des Vektors vor Dephosphorylierung zu achten.

Die nötigen Verhältnisse zur Ligation wurden mit folgenden Formeln kalkuliert:

$$Masse_{Insert} [ng] = 3 * Stoffmenge_{Vektor} [mol] * \frac{660 \text{ ng} * 10^9}{mol * bp} * Größe_{Insert} [bp]$$

Berechnung der benötigten Masse des Fragmentes

$$Stoffmenge_{Vektor} [mol] = \frac{Masse_{Vektor} [ng]}{\frac{660 \text{ ng} * 10^9}{mol * bp} * Größe_{Vektor} [bp]}$$

Berechnung der molaren Menge des Vektors

Ligationsansatz (21 µL)

Fragment DNA	xxx µL (nach Formel Masse _{Insert})
Vektor DNA (Plasmid) dephosphoryliert	xxx µL (30 - 60 ng)
T4-DNA-Ligase Puffer (10X)	2,0 µL
PEG 4000 (50%)	2,0 µL
dH ₂ O	ad 20,0 µL
T4-DNA-Ligase	1,0 µL

Der Ligationsansatz wurde in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktions-Gefäß auf Eis pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht (14 - 16 h) bei 16 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz zur Transformation chemisch kompetenter E.Coli-Bakterien verwendet (Kapitel 2.2.1.8).

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) ist ein Verfahren zur zielgerichteten exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Fragmentes *in vitro*. Die PCR wurde zu Klonierungszwecken sowie zur Bestimmung des Mausgenotyps bei der Generierung der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse (β -DLK^{-/-}) bestimmt (Kapitel 2.2.1.7.c).

2.2.1.7.a Klonierung der pcDNA3.1-DLK-Mutanten

Mittels *site-directed mutagenesis* wurden zwei putative Calcineurin-Interaktionsdomänen (PxlIT und LxVP) innerhalb der DLK modifiziert, in dem man bestimmte Aminosäuren des entsprechenden Konsensusmotifs mutierte.

Alle Mutationen wurden unabhängig voneinander und in analoger Weise hergestellt. Es wurden je zwei innere und zwei äußere Primer (BstEII_ *forward* und XhoI_ *reverse*) hergestellt. Die inneren Primer (*forward* und *reverse*) trugen die Mutation komplementär zueinander, sodass nach Synthese der jeweiligen Fragmente eine Hybridisierung über diesen Abschnitt möglich war. Die zwei äußeren Primer hybridisierten an den Restriktionsstellen BstEII (Eco91I) und XhoI der *template* DNA und flankierten die Mutation an den Enden, um eine Ligation in den Vektor über diese Restriktionsstellen zu ermöglichen (Abbildung 2.3). Im ersten Schritt (**Fragment PCR**) wurden die Produkte A und B mit dem jeweiligen Primer-Paar getrennt voneinander synthetisiert. Hierbei diente der pcDNA3.1-DLK wt (DLK wt) als *template*. Die Fragmente wurden in ausreichender Menge mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Äquimolaren DNA-Mengen dieser Fragmente wurden für eine zweite PCR eingesetzt, eine sogenannte **primerless PCR**. In diesem Schritt fungieren die DNA-Fragmente als *template* und Primer zugleich. An den überlappenden Enden der mutierten Fragmente hybridisieren beide Produkte und werden mithilfe der dNTPs und Polymerase bis zum nächsten Ende verlängert.

Für den letzten Schritt wurden 3 - 6 μ L dieses Ansatzes entnommen und als *template* für die **Amplifikation PCR** eingesetzt. In diesem neuen Ansatz sind die äußeren Primer für die endgültige Amplifikation verantwortlich.

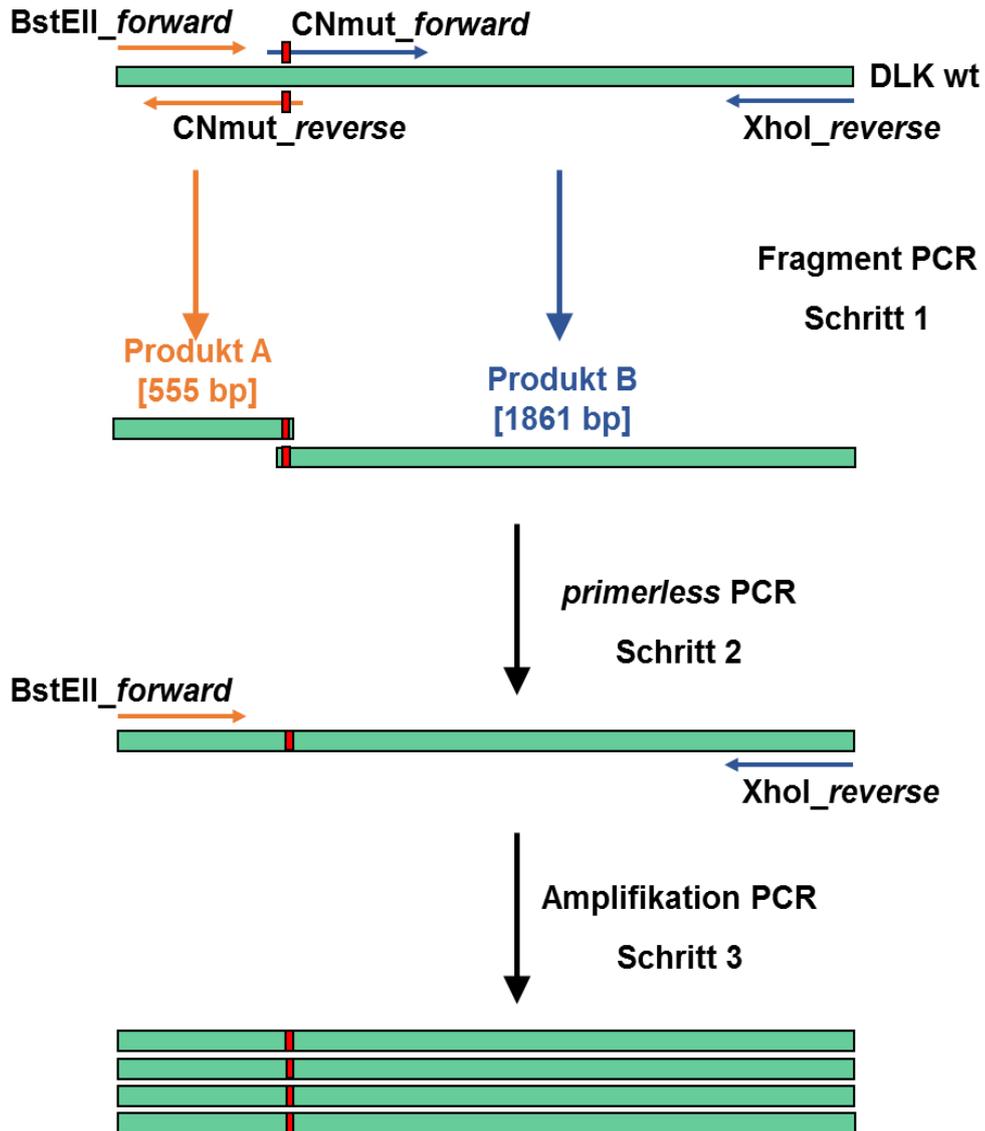


Abbildung 2.3: Schema zur Herstellung der pcDNA3.1-DLK-Mutanten mittels *site-directed mutagenesis*. Schritt 1: Die DNA-Fragmente (Produkte A und B) wurden jeweils mit dem Primer, der die einzuführende Mutation (Mutation = rote Striche) trägt, dem äußeren Primer und mit DLK wt als *template* über die Fragment PCR synthetisiert. Schritt 2: Die Produkte fungierten als *template* und zugleich als Primer für die *primerless* PCR. Schritt 3: Die Zugabe der äußeren Primer ermöglichte die Amplifikation des mutierten DNA-Fragmentes.

Für die Mutation **DLK CN1** wurden das Met-275 und das Iso-277 in der PxlIT-Calcineurin-Interaktionsdomäne in Arg-275 und Lys-277 (273-PNMLIT-278 in 273-PNRLKT-278) mutiert. Für **DLK CN2** wurden das Leu-362 und das Val-364 des LxVP-Motifs jeweils in Ala (362-LPVP-365 in 362-APAP-365) verändert.

Zur Herstellung der Doppelmutante **DLK CND**, welche beide Mutationen (273-PNRLKT-278 und 362-APAP-365) besitzt, wurden die Plasmide von DLK CN1 und DLK CN2 mittels Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym BbvCI geschnitten (Abbildung 2.4) und das jeweils mutierte Stück zur Ligation verwendet.

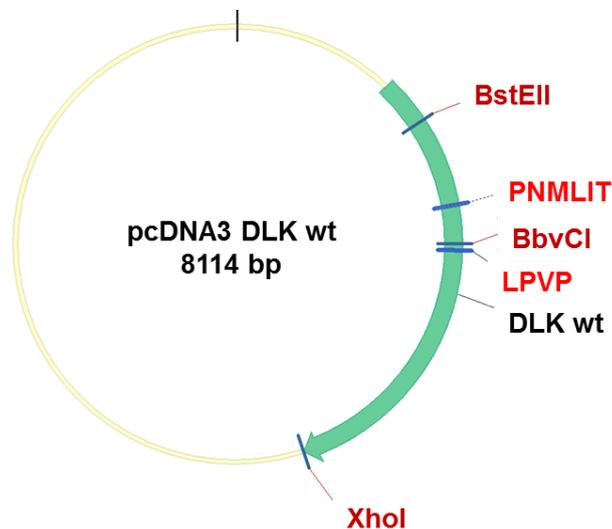


Abbildung 2.4: Schema des pcDNA3.1-DLK wt mit den Calcineurin-Interaktionsdomänen und Restriktionsenzymen zur Herstellung der DLK CND.

Als *template* DNA wurde das mutierte DLK CN1 verwendet und mit BbvCI und XhoI in einem Doppelrestriktionsenzymverdau geschnitten. Das längere Fragment bestehend aus 6490 bp wurde hier mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgeschnitten. Das fehlende kürzere Fragment (1624 bp) wird aus dem Restriktionsenzymverdau mit BbvCI und XhoI und der mutierten DLK CN2 aufgereinigt. Nach der DNA-Extraktion aus den Gelfragmenten wurden beide DNA-Abschnitte mittels der T4-DNA-Ligase verknüpft.

Weitere pcDNA3.1-DLK-Mutaten wurden mit dem pcDNA3.1-DLK wt als *template* erzielt: **DLK L362A, DLK L362R, DLK V364A, DLK Y343A, DLK Y343F, DLK W334A, DLK NES.**

Tabelle 2.1: Primer der pcDNA3.1-DLK-Mutanten

Name	Primersequenz (5'→3')
BstEII for	ACTG <u>GGTCACCT</u> GAGAGTCGAGCA
XhoI rev	TGCATG <u>CTCGAGT</u> CATGGAGGAAG
CN1 for	GTCACCCAAC AGG CTA AAA ACATACGA
CN1 rev	TCGTATGT TTT TAG CCT GTTGGGTGAC
CN2 for	CTCCAC GCT CCT GCC CCCTCCAGC
CN2rev	GCTGGAGGG GGC AGG AGC GTGGAG
L362A for	CTCCAC GCT CCTGTACCCTCCAGC
L362A rev	GCTGGAGGGTACAGG AGC GTGGAG
L362R for	CTCCAC CGA CCTGTACCCTCCAGC
L362R rev	GCTGGAGGGTACAGG TCG GTGGAG
V364A for	CTCCACCTGCCT GCC CCCTCCAGC
V364A rev	GCTGGAGGG GGC AGGCAGGTGGAG
Y343A for	TGGAGAGATTCCC GCT AAAGATGTAGA
Y343A rev	TCTACATCTTT AGC GGGAATCTCTCCA
Y343F for	TGGAGAGATTCCC TTT AAAGATGTAGA
Y343F rev	TCTACATCTTT AAA GGGAATCTCTCCA
W334A for	GTGCTA GCA GAACTACTGACTGGA
W334A rev	TCCAGTCAGTAGTTCT TGC TAGCAC
NES for	CTCATG GCG CAAG GCAGAA GCG AAAGAGAGGG
NES rev	TTT CGC TTCT TGCTT GCGC CATGAG

Mutierte Aminosäuren in **rot und fett**. Palindromische Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme in kursiv und unterstrichen.

2.2.1.7.b Generierung der pMAL-MBP-TEV-DLK-Konstrukte

Verwendet wurde das pMAL-MBP-DLK wt als *template* zur Insertion der TEV (Tobacco Etch Virus)-Spaltungserkennungssequenz. Die kodierende Sequenz für DLK wt₁₄₀₋₅₁₇ (140aa - 517aa) wurde in den Vektor pMAL-c2x einkloniert, um das pMAL-MBP-DLK wt herzustellen (Dissertation Rohollah Babaeikeshomi). DLK wt Protein ist somit mit MBP (*Maltose Binding Protein*) an seinem N-terminalen Ende fusioniert.

Zur Herstellung des pMAL-MBP-TEV-DLK wt wurden zunächst *forward* und *reverse* Primer designt, welche die TEV-Spaltungserkennungssequenz (Pfeil zeigt die Spaltungsstelle) enthalten:

TEV: 5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGC-3' → Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly

Der pMAL-MBP-DLK wt kann wie folgt veranschaulicht werden:

pMAL-c2x-NdeI-MBP-BamHI-DLK wt-Sall-pMAL-c2x
Vektor Proteinsequenz Vektor
Restriktionstellen

Die Restriktionsstellen NdeI und Sall wurden zum Design der äußeren Gegenprimer und zur Synthese der jeweiligen Fragmente verwendet. Die Fragmente NdeI-MBP-TEV (1209 bp) und TEV-BamHI-DLK wt-Sall (1171 bp) wurden getrennt hergestellt, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Mittels *primerless* PCR und anschließender Amplifikation wurde das veränderte Fragment erzeugt (2380 bp):

pMAL-c2x-NdeI-MBP-TEV- BamHI-DLK wt-Sall-pMAL-c2x

Als Vektor zur Ligation diente der mit den Restriktionsenzymen NdeI und Sall geschnittene pMAL-MBP-DLK wt (5454 bp).

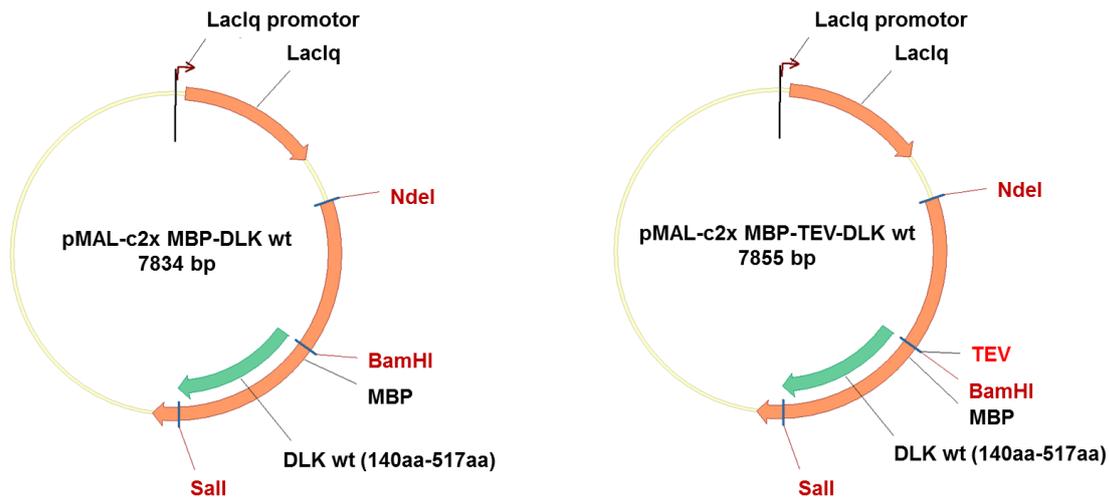


Abbildung 2.5: Schema der pMAL-c2x MBP-DLK wt (links) und pMAL-c2x MBP-TEV-DLK wt (rechts) Plasmide.

Zur Umklonierung der Mutationen der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne von dem pcDNA3.1-Vektor in den MBP-TEV-Vektor wurden die bereits hergestellten pcDNA3.1-DLK-Mutanten als *template* eingesetzt. Die Schnittstellen BamHI und Sall werden mit den Primern eingefügt. Die Fragment PCR soll nicht nur die Schnittstellen einfügen, sondern auch die entsprechenden Mutanten DLK L362A, DLK V364A und DLK L362A/V364A (DLK CN2) amplifizieren. Die entsprechende Bande ist ca. 1,2 kb groß und entspricht der Länge des DLK wt Proteins (140aa – 517aa). Als Vektor diente das pMAL-MBP-TEV-DLK wt nach Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und Sall (ca. 6,7 kb).

Tabelle 2.3: Primer der pMAL-MBP-TEV-DLK-Konstrukte

Name	Primersequenz (5'→3')
NdeI-MBP for [#]	CAAGGACCATAG <u>CATATG</u> AAAATCGAAGAAG
TEV-MBP rev [#]	GCCCTGAAAATACAGGTTTTTC GAATTCTGAAATC
TEV-MBP for [#]	GAAACCTGTATTTTCAGGGC <u>GGATCCT</u> CCACAG
Sall-MBP rev (neu) [#]	CCTGCAGG <u>TTCGACG</u> TTTCCATGTAGGAGG
BamHI-MBP for [*]	AAG <u>GGATCCT</u> CCACAGAACACAAG (BamHI-DLK _{140aa})
Sall-MBP rev [*]	AAGT <u>GTTCGACG</u> TTTCCATGTAGGAGG (DLK _{517aa} -Sall)

TEV-Erkennungssequenz (**rot und fett**). Palindromische Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme in *kursiv und unterstrichen*. [#]Primer zur Generierung von pMAL-MBP-TEV-DLK wt; ^{*}Primer entworfen von Rohollah Babaeikelishomi (Dissertation).

2.2.1.7.c Bestimmung des Mausgenotyps bei der Generierung der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse (β -DLK^{-/-})

Für die Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurden Schwanz- oder Ohrbiopsien von neugeborenen Mäusen entnommen. Die DNA-Extraktion aus dem Gewebe sowie der PCR-Mischungsansatz wurden nach der Anleitung des Herstellers vom KAPA® Mouse Genotyping Hot Start Kit durchgeführt.

Die verwendeten Primer und Protokolle sind den Tabellen 2.4 und 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.4: Primer zur Genotypisierung der Mäuse

Name	Primersequenz (5'→3')
neo for*	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG
neo rev*	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAG
loxP-3' for	CTGCACTGGCCTGCAGAAAACACAT
loxP-3' rev	ATGAACTGATGGCGAGCTCAGACCA
flp-Deleter for*	GTCACTGCAGTTTAAATACAAGACG
flp-Deleter rev*	GTTGCGCTAAAGAAGTATATGTGCC
Cre GLOB for*	TAACATTCTCCCACCGCTAGTACG
Cre GLOB rev*	AAACGTTGATGCCGGTGAACGTGC
Cre RIP for [#]	GGAAAATGCTTCTGTCCGTTTTG
Cre RIP rev [#]	CGCATAACCAGTGAAACAGCATT
E2 for	CCAGATCCCTGTAAGAACACCCTCCATT
E5 for	CTCAGATTTTGGCACTTCCAAGGAGCTG
E7 rev	TCTCCTGGGGTGTAGAGAGCACATCA

[#]Primer entworfen von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (Transgene Tiere, ZMNH); [#]Primer entworfen in der Gruppe von Kathrin Maedler (Universität Bremen) (mod. Herrera, 2000).

Tabelle 2.5: PCR-Protokolle zur Genotypisierung der Mäuse

Programm „LoxP-3“:			Programm „neo/flp/CreGLOB/CreRIP“:	
95 °C	3 min		95 °C	3 min
95 °C	15 s	x 35	95 °C	15 s
58 °C	10 s		55 °C	10 s
72 °C	10 s		72 °C	10 s
72 °C	5 min		72 °C	5 min
Fragmentgröße: 131 bp			Fragmentgröße: 795 bp (neo) 480 bp (flp) 214 bp (Cre GLOB) 250 bp (Cre RIP)	
Programm „EXON“:				
95 °C	3 min			
95 °C	15 s	x 35		
55 °C	10 s			
72 °C	35 s			
72 °C	10 min			
Fragmentgröße: 907 bp 1178 bp 1258 bp				

Genotypisierung-Programme für den Bio Rad T100® Thermocycler.

2.2.1.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation ist eine molekularbiologische Methode, um exogene Plasmid DNA in "kompetente" Bakterienzellen einzuführen. Diese fremde rekombinante Plasmid DNA ist mit einem bakteriellen Replikationsursprung ausgestattet, welcher von den Zell-DNA-Polymerasen erkannt und wie die eigene DNA repliziert wird. Zur Selektion der von den Bakterienzellen aufgenommenen Plasmid DNA werden in der Regel Antibiotika-Resistenz Gene, beispielsweise für die β -Lactamase, in den Vektor der Plasmid DNA eingebaut.

Chemisch kompetente Zellen (100 μ L Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut. 30 - 100 ng Plasmid DNA wurden hinzu pipettiert und für 30 min auf Eis gelagert. Diese Plasmid-Zellen-Mischung wurde bei 42 °C für 90 s inkubiert und anschließend für weitere 90 s auf Eis gehalten. 900 μ L SOC-Medium wurden den Bakterienzellen zugesetzt und bei

37 °C für 45 min in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 1.000 xg für 2 min zentrifugiert und der Überstand durch kurzes Kippen verworfen. Schätzungsweise 100 µL der übrigen Bakteriensuspension wurden auf einer bei 37 °C vorgewärmten LB-Agarplatte mit Ampicillin (50 µg/mL) als Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 DNA-Minipräparation

High pure Plasmid Isolation Kits wurden zur Plasmid-DNA-Extraktion eingesetzt. Die schnelle Verifizierung vieler Kolonien nach der Klonierung wurde durch folgende modifizierte Mini-Präparation der konventionellen Methode ermöglicht (Sambrook et al., 1989):

Buffer Q1 (Lagerung bei 4°C)

Tris/HCl pH 8,0	50 mM	6,06 g Tris/HCl
EDTA pH 8,0	10 mM	3,72 g EDTA · 2H ₂ O
Vor Gebrauch frisch zugeben:		
Rnase A	100 µg/mL	100 mg RNase A
dH ₂ O		ad 1000 mL

Buffer Q2 (Lagerung bei RT)

NaOH	200 mM	8,0 g NaOH Plätzchen
SDS	1%	50 mL 20%-SDS-Stammlösung
dH ₂ O		ad 1000 mL

Buffer Q3 (Lagerung bei RT)

Kaliumacetat (pH 5,5) 3 M	299,5 g Kaliumacetat
dH ₂ O	ad 1000 mL

Nach erfolgreicher Transformation wurden einige der auf der LB-Amp-Agarplatte (50 µg/mL) gewachsenen Kolonien gepickt und in einem 15 mL Plastikröhrchen mit 4 mL LB-Amp-Medium (50 µg/mL) über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag für 5 min bei 4.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment

wurde in 250 μL „Q1 Buffer“ resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im folgenden Schritt wurden 250 μL des „Q2 Buffer“ rasch am Rand des Reaktionsgefäßes vorsichtig hinzugegeben und 5 - 8 Mal durch sanftes Invertieren gemischt. Anschließend wurde für max. 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Bakterienlyse wurden 300 μL des „Q3 Buffer“ langsam hinzugefügt, erneut achtmal invertiert und für 15 min bei 4°C und bei höchster Leistung (14.000 - 15.000 U/min) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde verworfen und der Überstand in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Danach schloss sich eine DNA-Ethanol-Präzipitation an. Das dreifache Volumen eiskalten absoluten Ethanol wurde zugegeben, mehrmals geschwenkt und für 45 min bei -20 °C gelagert.

Nach dieser Inkubationsphase wurde die DNA-Mischung bei 4 °C und 14.000 U/min für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die präzipitierte DNA mit 1 mL einer 70% (v/v) Ethanol-Lösung für 5 min gewaschen. Anschließend wurde die Lösung erneut bei 4 °C und 14.000 U/min für 15 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Präzipitat bei Raumtemperatur für 5 - 10 min getrocknet. Der getrocknete Plasmid-DNA-Pellet wurde in 20 - 30 μL TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Zur Überprüfung der Identität wurde ein Restriktionsenzymverdau verwendet.

2.2.1.10 DNA-Maxipräparation

Um große Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu isolieren, wurden High Pure Maxiprep Kits entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Hierfür wurden 500 mL LB-Amp-Medium (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit dem positiv getesteten und sequenzierten Klon (Glycerol-Stock) in einem 1000 mL Erlenmeyerkolben über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 U/min inokuliert. Am Folgetag wurde bis zur OD_{600} von 6,0 - 8,0 inkubiert. Nach Erreichen der optischen Dichte wurde die Kultur auf zwei 250 mL Zentrifugen-Becher verteilt und in einer vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 4 °C und 4.500 U/min zentrifugiert. Danach wird nach den Herstellerangaben gearbeitet.

Das luftgetrocknete Plasmid DNA-Pellet wurde je nach Dichte (optische Inspektion) entweder in 80 μL oder 100 μL TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Verifizierung der mittels Restriktionsverdau als positiv identifizierten Klone. Dieses Verfahren gibt Aufschluss über die exakte Nukleotidabfolge eines DNA-Fragmentes.

Der Sequenzierungsservice von Eurofins MWG Operon wurde verwendet, um die hergestellten Konstrukte zu sequenzieren. Die gelieferte FASTA-Sequenz wurde mithilfe der Software *Vector NTI*® analysiert.

Die zu bestimmende Plasmid DNA wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und auf 15 µL mit dH₂O aufgefüllt. Anschließend wurden 2 µL des gewünschten *Seq*-Primers (10 pmol/µL) hinzugegeben. Das Endvolumen betrug 17 µL.

Folgende Anforderungen gelten für das Designen eines eigenen Sequenzierungs-Primers:

- Länge: 16 - 25 bp
- Schmelztemperatur (T_m): 50 - 62 °C
- GC-Gehalt: 35 - 60%

2.2.2 Protein orientierte Experimente

2.2.2.1 Zellyse zur Proteinanalyse

Die Ernte von HIT-Zellen konnte 48 h nach der transienten Transfektion oder 24 h nach dem Ausplattieren (Kapitel 2.2.3.1) unter nicht sterilen Bedingungen vorgenommen werden. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums und dreimaligem Waschen mit 1x PBS auf Eis mit 80 - 100 µL DLK-Lysis-Puffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (1x phosSTOP™ und 1x cOmplete™) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber gesammelt und in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, enthielt eine Proteinprobe die Ernte von 2 *wells*, welche mit 80 - 100 µL DLK-Lysis-Puffer gesammelt wurden. Das Zell-Lysat wurde zusätzlich mit einer 27G Nadel und einer Tuberkulinspritze dreimal geschert und für 30 min auf Eis stehen lassen. Anschließend wurde das Zell-Lysat mit 14.000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1 µL dieser Lösung wurde zur

Proteingehaltsbestimmung eingesetzt. Die Proteinextrakte werden nach ihrer Ernte bei -80 °C aufbewahrt.

DLK-Lysis-Puffer 1x

HEPES (pH 8,0)	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EGTA (pH 8,0)	1,0 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%
Nonidet™ P-40 (NP40)	0,5%
phosSTOP™*	1 x
cOmplete™*	1 x
dH ₂ O	ad 100 mL

*Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden vor Gebrauch frisch zugegeben.

2.2.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

2.2.2.2.a Bestimmung mittels Bradford Protein Assay

Die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford wird zur Quantifizierung des Proteingehaltes einer zu untersuchenden Probe verwendet.

Die Intensität der blauen Färbung verhält sich bei 595 nm (Absorptionsmaximum) direkt proportional zu dem Proteingehalt in der zu untersuchenden Probe (Bradford, 1976). Diese Proportionalität zwischen Proteingehalt und Intensität wird durch eine Kalibriergerade empirisch ermittelt. Hierfür wird ein definiertes Protein, wie BSA (bovine serum albumin), in aufsteigenden Konzentrationen gemessen und eine Standardkurve generiert. Es wurden BSA-Konzentrationen zwischen 0,1 µg/mL und 30,0 µg/mL angefertigt und mit dem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen. Das Photometer ermittelt die Kalibriergerade und rechnet automatisch für jede Messung den Proteingehalt der Probe aus.

Für die photometrische Proteingehaltsbestimmung wurde 1 µL Zelllysat in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µL Bio-Rad-Reagenz und 799 µL dH₂O versetzt und gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Mischung in eine 1 cm

Kunststoffküvette überführt, mittels des Spektralphotometers gemessen und der Proteingehalt in $\mu\text{g/mL}$ abgelesen.

2.2.2.2.b Semi-quantitative Bestimmung mittels SDS-PAGE

Diese Methode wurde nur zur Proteingehaltsbestimmung der Protein-Aufreinigung (Kapitel 2.2.2.6) verwendet. Bei dieser Methode wurde die Proteinkonzentration zunächst mittels Nanodrop™ bestimmt. Hierfür wurde, wie bei der Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 2.2.1.3), 1 μL der Proteinlösung gegen 1 μL des verwendeten Puffers zur Proteinextraktion gemessen.

Es wurde je nach Qualität der aufgereinigten Proteine ein Konzentrationsintervall gewählt. Diese Qualität wurde anhand der nach Coomassie Blue gefärbten Gele (Kapitel 2.2.2.4) durch die An- oder Abwesenheit anderer Banden optisch ermittelt.

Für BSA wurden die Konzentrationen 1,0; 1,5 und 2,0 μg eingesetzt.

Alle Proben wurden mit dem entsprechenden Puffer auf 20 - 30 μL Endvolumen aufgefüllt und einer SDS-PAGE unterzogen. Anschließend wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt, die Gele mit Zellophan-Papier getrocknet und ab fotografiert.

Die erwarteten Banden wurden mittels „Quantity One“ nach ihrer Intensität ausgewertet und mit den BSA-Banden (72 kDa) verglichen (Abbildung 2.6).

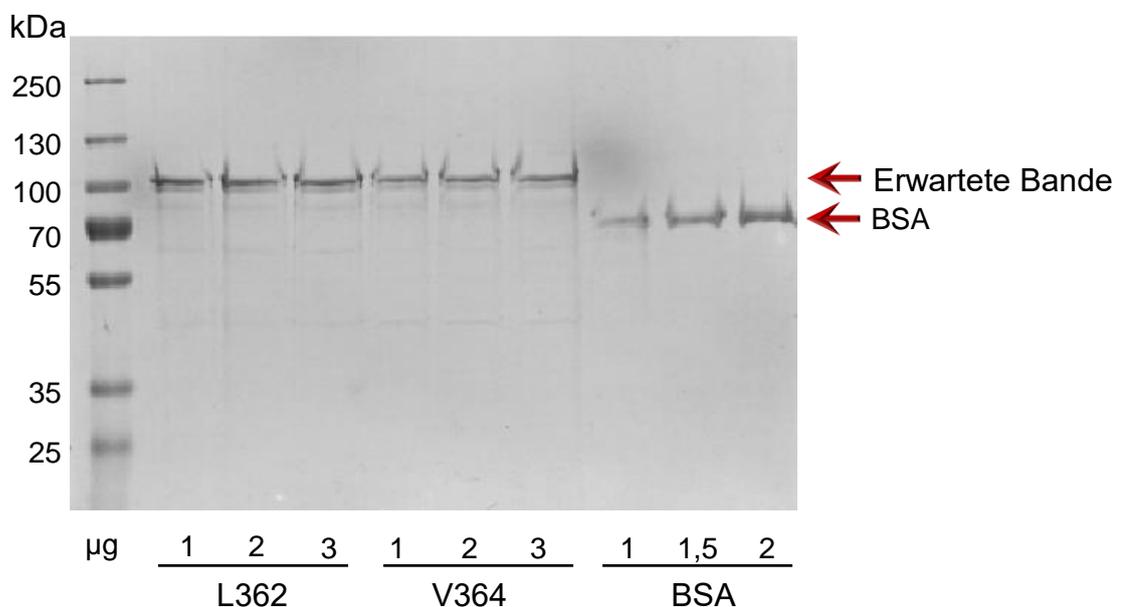


Abbildung 2.6: Exemplarische Aufnahme einer semi-quantitativen SDS-PAGE. Verschiedene Mengen (in μg) der gereinigten Proteine der pMAL-c2x MBP-DLK-Mutanten L362A und V364A (94 kDa, erwartete Bande) wurden auf die Menge der eingesetzten BSA-Konzentrationen (72 kDa) bezogen und quantifiziert.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molaren Masse (kDa) in einem angelegten elektrischen Feld (Laemmli, 1970).

Das hierzu verwendende Gel setzt sich aus zwei unterschiedlichen Gelanteilen zusammen: das Sammelgel (pH 6,8) und das Trenngel (pH 8,8). Das Erstere dient dem Sammeln der Proteine, während das Trenngel die eigentliche Größentrennung bewirkt.

Sammel- und Trenngele wurden unter Verwendung von Glasplatten, einem Platzhalter und eines geeigneten Kammes zur Bildung der Auffangtaschen in eine Gießkammer gegossen (Mini-protein Tetra System, Bio-Rad).

Zunächst wurde das Trenngel zu etwa 2/3 zwischen 2 Glasplatten in die Kammer gegossen. Anschließend wurde 1 mL reines Isopropanol zum Nivellieren hinzu pipettiert. Nach ca. 20 min wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel über das Trenngel bis zum Überlaufen geschichtet. Der Kamm für die Probetaschen wurde zügig in das noch flüssige Gel eingesetzt. Nach 20 min Polymerisationszeit wurde das feste Gel in die dazugehörige Elektrophorese-Kammer eingespannt, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und die Kämme entfernt.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden gleiche Mengen Protein auf dasselbe Endvolumen mit dem entsprechenden Lösungspuffer adjustiert. Nach Zugabe von *Loading dye* (1/4 des Endvolumens) wurden die Proben für 5 min bei 95 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) denaturiert.

Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Proteinmolekulargewichtsmarker (6 µL) in unterschiedlichen Taschen pipettiert und eine 80 V Spannung (Bio Rad PowerPac®) für 10 min angelegt, bis die Proben vom Sammelgel in das Trenngel übergehen. Nach dieser Zeit wurde die Spannung auf 100 V erhöht, bis die gewünschten Proteingrößen aufgetrennt waren.

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose Träger-Membran zum Zweck eines Immunoblots (Kapitel 2.2.2.5) übertragen.

Zur Größentrennung der gewünschten Proteine wurde nach folgender Tabelle die passende Acrylamid-Konzentration zur Herstellung der Trenngele gewählt:

Tabelle 2.6: Korrelation zwischen % Acrylamid und Molekulargewicht kDa

% Acrylamid	Molekulargewicht (kDa)
6	60 - 212
8*	30 - 120
10*	18 - 75
12	15 - 60
15	15 - 45

*Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konzentrationen 8 und 10 % gewählt.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Trenngel (1 Gel, 3 mL)

kDa	%	dH ₂ O	30% Acrylamid	1,5 M Tris pH 8,8	10% SDS	TEMED	10% APS
30 - 120	8	2,3 mL	1,33 mL	1,25 mL	50 µL	5 µL	50 µL
18 - 75	10	2,0 mL	1,67 mL	1,25 mL	50 µL	5 µL	50 µL

Sammelgel (1 Gel, 3 mL)

%	dH ₂ O	30% Acrylamid	0,5 M Tris pH 6,8	10% SDS	TEMED	10% APS
4	1,8 mL	400 µL	750 µL	30 µL	3 µL	30 µL

Es wurden alle Chemikalien der Reihe nach bis einschließlich TEMED in ein 50 mL Tube pipettiert und gemischt. Kurz vor dem Gießen des jeweiligen Gels wurde das aliquotierte 10% APS hinzugefügt (1 g APS in 10 mL).

Die für SDS-PAGE benötigten Puffer werden wie folgt hergestellt:

Sammelgel-Puffer (0,5 M; pH 6,8)

Tris HCl pH 6,8	0,5 M	6,08 g
SDS	0,4% (w/v)	4 mL (10% SDS)
dH ₂ O	ad 100 mL	

Trenngel-Puffer (1,5 M; pH 8,8)

Tris HCl pH 8,8	1,5 M	36,31 g
SDS	0,4% (w/v)	8 mL (10% SDS)
dH ₂ O	ad 200 mL	

Laufpuffer 1x

Laufpuffer 5 x	400 mL
dH ₂ O	ad 2 L

Laufpuffer 5x

Tris HCl	250 mM	30,2 g
Glycine	1,9 M	144 g
SDS	0,5%	10 g
dH ₂ O		ad 2 L

Loading dye

0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 mL
20% SDS	2,0 mL
1% Bromophenolblau	0,2 mL
Glycerol	5,0 mL

→ Aliquots a 250 µL (Vor Gebrauch 15 µL β-Mercaptoethanol zugeben)

2.2.2.4 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung (Coomassie Färbung)

Die zu untersuchenden Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Polyacrylamid (PA)-Gele wurden zunächst zweimal mit dH₂O für jeweils 5 min gewaschen. Danach wurden die PA-Gele in die Coomassie-Färbelösung überführt und unter ständigem Schwenken für 15 min inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entsorgt und der Entfärber hinzugegeben. Nach 1 h wurde der Entfärber erneuert und für 1 - 2 h weiter inkubiert, bis ein klares Gel mit blauen Banden sichtbar war. Anschließend wurde die Lösung gegen dH₂O getauscht und über Nacht belassen. Zum

Schluss wurde das Gel entweder fotografiert oder, für den Fall einer quantitativen Auswertung, getrocknet.

Coomassie Färbelösung

Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,25% (w/v)	2,5 g
Methanol	40% (v/v)	400 mL
Eisessig	10% (v/v)	100 mL
dH ₂ O		ad 1 L

Entfärber

Isopropanol	25% (v/v)	250 mL
Eisessig	10% (v/v)	100 mL
Methanol	10% (v/v)	100 mL
dH ₂ O		ad 1 L

2.2.2.5 Immunoblot (Western Blot)

Der Western Blot ist eine molekularbiologische Methode zum qualitativen Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch.

Die zu untersuchenden Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden aus den Glasplatten der Gießkammer entnommen, das Trenngel vom Sammelgel befreit und das Trenngel für 5 min bei RT mit dH₂O gewaschen. Gleichzeitig wurde die zurecht geschnittene Nitrocellulose-Membran mit dH₂O für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 1x Transferpuffer für weitere 5 min belassen.

Das Gel, die Membran sowie die mit 1x Transferpuffer befeuchteten Filter wurden wie in Abbildung 2.7 in der Transferkammer angeordnet.

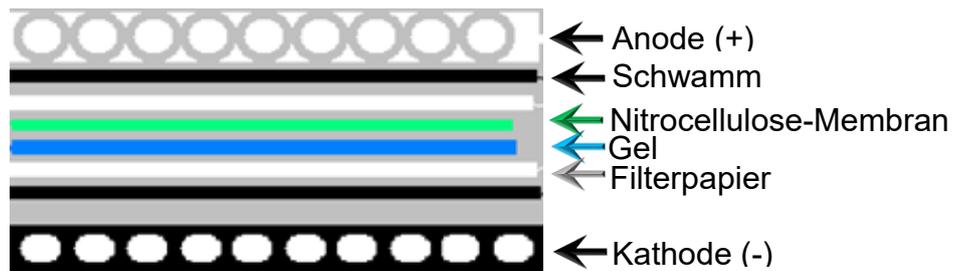


Abbildung 2.7: Repräsentative Darstellung der für den Transfer verwendeten Anordnung in der Transferkammer (nasser Transfer).

Die Transferkammer wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt und es wurde ein elektrischer Strom von 400 mA für 2 h angelegt. Abschließend wurde die auf die Membran transferierte Proteine mit 1x TBS dreimal gewaschen und mit einer 5% Milch-Lösung (in 1x TBS) für 2 h geblockt.

Danach wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in 5% Milch (in 1x TBS-T) für 2 h bei RT.

Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Signalmolekül wurde mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) detektiert. Das Signalmolekül ist die Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*), welche die Reduktion von Dioxetanen (z.B. Luminol) katalysiert und dabei eine Lumineszenz erzeugt.

Die erzeugte Lumineszenz wurde mittels sogenannter Chemilumineszenz-Dokumentation-Bildgebungsverfahren (ChemiDoc-Imager, LAS 4000) gemessen. Anschließend wurde die optische Dichte der Protein repräsentierenden Banden mit der Software *Quantity One* ausgewertet.

Die hier verwendeten Pufferlösungen werden wie folgt hergestellt:

Transfer-Puffer 1x

Glycin	192 mM	28,8 g
Tris-Base	25 mM	6,04 g
Methanol	20% (v/v)	400 mL
dH ₂ O		ad to 2 L

Tris-buffered saline (TBS)-Puffer (pH 7,6)

Tris-Base	50 mM	6,1 g
NaCl	150 mM	8,8 g
dH ₂ O		ad 1 L

TBS mit Tween (TBS-T)-Puffer

Tween® 20	0,1% (v/v)	1 mL
TBS		ad 1 L

Blockpulver

Milchpulver	5% (w/v)	2,5 g
TBS		ad 50 mL

2.2.2.6 Protein-Aufreinigung

Für die Extraktion von Proteinen wurde die Ultraschall-Lyse in Kombination mit Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen (chemische Lyse) genutzt.

Dazu werden die aus den Zellen extrahierten Proteine mittels Affinitätschromatographie isoliert. Bei diesem Verfahren wird das Protein an ein Affinitäts-tag (Markierung, *engl. tag*) fusioniert, das ein spezifisches Bindungssubstrat aufweist. Durch diese Markierung können die fusionierten Proteine an beschichteten Harzen spezifisch binden, um die Trennung von anderen Biomolekülen zu ermöglichen.

Durch Zugabe eines großen Überschusses des Bindungssubstrats werden die am Harz gebundenen Proteine verdrängt (Elution). Abschließend werden die gereinigten Proteine mittels Dialyse vom Bindungssubstrat im Eluat befreit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fusionssysteme His₆ (Polyhistidin) mit Imidazol als Bindungssubstrat und MBP (Maltose Bindendes Protein) mit Amylose als Bindungssubstrat verwendet.

2.2.2.6.a His₆-tagged Fusionssysteme

Das zur Expression von Calcineurin verwendete Plasmid (*pET15b-derived p11 bicistronic bacterial expression vector*, pET15b-p11-CNA₁₋₃₉₁/CNB₁₋₁₇₀) stellte die Arbeitsgruppe von PhD. Wolfgang Peti (Brown University, USA) zur Verfügung. Die kodierenden Sequenzen der Calcineurin-Untereinheiten A und B (CNA₁₋₃₉₁/CNB₁₋₁₇₀) sind mit einem N-terminalen Polyhistidin-tag (His₆) gefolgt von einer TEV- Spaltungserkennungssequenz fusioniert. Die Expression des getaggtten Proteins steht unter der Kontrolle des an einem T7-Promotor gebundenen Lac-Operons. Da der

MATERIAL UND METHODEN

virale T7-Promotor die bakterielle T7-RNA-Polymerase für den Start der Transkription und die Proteinexpression benötigt, wurden hier BL21-DE3 chemisch kompetente Bakterienzellen für die Transformation verwendet. In Anwesenheit und Bindung von Lactose oder ähnlichen Molekülen wie IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) an dem Lac-Repressor wird die Expression des Fusionsproteins eingeleitet.

Die zur Aufreinigung von His₆-tagged Fusionssystemen verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet:

Extraktionspuffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	0,32 g
NaCl	1 M	5,84 g
Glycerol	20% (v/v)	20 mL
Tween® 20	0,1% (v/v)	100 μ L
ZnCl ₂	10 μ M	1 mL (1 mM Stammlösung)
Imidazol	10 mM	4 mL (1 M Stammlösung)
DTT	1 mM	100 μ L (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	1 mL (100 mM Stammlösung)
dH ₂ O		ad 100 mL

Elution-Puffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	0,03 g
NaCl	1 M	0,58 g
ZnCl ₂	10 μ M	100 μ L (1 mM Stammlösung)
Imidazol	100 mM	1 mL (1 M Stammlösung)
DTT	1 mM	10 μ L (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	100 μ L (100 mM Stammlösung)
dH ₂ O		ad 10 mL

Dialysepuffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	3,15 g
NaCl	1 M	58,44 g
ZnCl ₂	10 µM	10 mL (1 mM Stammlösung)
DTT	1 mM	1 mL (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	10 mL (100 mM Stammlösung)
dH ₂ O		ad 1 L

2.2.2.6.a.I Screening

Ein Screening ermöglicht diejenigen Kolonien zu identifizieren, in denen die Proteinexpression am stärksten durch IPTG induzierbar ist. Nach erfolgter Transformation wurden 14 Kolonien gepickt und mit je 5 mL LB-Amp-Medium (50 µg/mL) über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C und 200 U/min inokuliert. 100 µL jeder Bakteriensuspension wurden am nächsten Tag in 2 mL LB-Amp-Medium inokuliert, für 1 bis 2 h wie oben beschrieben inkubiert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 erreicht wurde.

500 µL jeder Bakteriensuspension wurden als Kontrolle in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dem Rest der Suspension wurden 1 mM IPTG hinzugegeben und weitere 2 - 3 h bei 37 °C inkubiert. 500 µL wurden entnommen, in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und als Kontrolle der IPTG-Induktion verwendet.

Beide Bakteriensuspensionen wurden vor und nach Zugabe von IPTG mittels Zentrifugation bei 6.000 U/min für 4 min pelletiert. 20 µL *Loading dye* wurden je Probe hinzugegeben und gemischt. Die Proteine wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach einer SDS-PAGE wurden die Gele mittels einer Coomassie-Färbung analysiert und die Bakteriensuspension mit der stärksten Proteinexpression für die Proteinreinigung ausgewählt. Der Rest der Suspension als Glycerol-Stock (1:1 mit 50% Glycerol) bei -80 °C verwahrt.

2.2.2.6.a.II Protein-Aufreinigung

Es wurden 10 mL LB-Amp-Medium mit der bestinduzierbaren Probe aus dem Glycerol-Stock geimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 U/min kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension in ein 1 L LB-Amp-Medium überführt und inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,6 mittels eines Spektralphotometers messbar war. Damit wurde das optimale Bakterienwachstum erreicht. 500 μ L der Bakteriensuspension wurden als Kontrolle 1 aufbewahrt und dem Rest 238 mg IPTG (1 mM Endkonzentration) hinzugegeben. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei 37 °C für 3 h. Nach Induktion wurden 500 μ L der Suspension als Kontrolle 2 entnommen. Die restliche Bakteriensuspension wurde bei 4.500 U/min für 15 min zentrifugiert (Thermoscientific Heraeus multifuge X3R). Das Pellet wurde in 30 mL Extraktionspuffer suspendiert und bei -80 °C über Nacht gelagert.

Die Kontrollen 1 und 2 wurden bei 15.000 U/min für 1 min zentrifugiert und in 10 μ L Extraktionspuffer erneut suspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde die Suspension in einem Eis-Methanol-Wasser-Gemisch aufgetaut und um eine Denaturierung des Proteins zu vermeiden, in diesem Bad die Ultraschall-Lyse durchgeführt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte mittels Sonicators (BANDELIN Sonopuls) durch eine siebenmalige Beschallung mit 40% Leistung und 30% Zyklen nach einem Muster von 2 min Beschallung und 1 min Pause. Die sonifizierte Lösung wurde bei 4 °C und 4.500 U/min für 30 - 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 mL Plastikröhrchen überführt. 10 μ L des Überstandes wurden als Kontrolle 3 aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Kontrolle 4 wurde mit einer Pipetten-Spitze eine kleine Menge des Pellets entnommen, mit 50 μ L Extraktionspuffer erneut suspendiert und 10 μ L dieser Suspension als Kontrolle behalten.

1 mL His-Bindungsharz wurde entnommen und dreimal für 5 min mit 10 mL Extraktionspuffer durch Rotieren auf einer rollenden Plattform gewaschen. Das Harz, Agarose-Perlen mit Nickel beschichtet, binden an das His₆-Fusionsprotein. Nach dem Waschen wurde es bei 900 U/min für 3 min zentrifugiert und der Extraktionspuffer gewechselt. Anschließend wurde das His-Bindungsharz in 1 mL Extraktionspuffer aufgenommen, dem Bakterienlysat hinzugegeben und auf einer rollenden Plattform bei 4 °C für 3 h inkubiert. Die Agarose-Nickel-Perlen wurden bei 1.200 U/min für 10 min zentrifugiert. 10 μ L des Überstandes werden als Kontrolle 5 aufbewahrt. Die

Perlen wurden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit 1 mL Extraktionspuffer bei 8 °C und 1.000 U/min für 2 min in einem Thermomixer gewaschen. Danach wurden die Perlen in 200 µL Elution-Puffer aufgenommen und bei 8 °C und 1.000 U/min für 5 min in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das eluierte Protein bei 4 °C und 15.000 U/min für 1 min von den Perlen getrennt. Das Eluat wurde in ein auf 4 °C gekühltes 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entspricht der Fraktion 1. Die Perlen wurden mit 200 µL Elution-Puffer aufgenommen und das Verfahren zweimal wiederholt (Fraktion 1 - 3).

In einer 96-well-Kulturplatte wurden 100 µL Bradford-Reagenz hinzugegeben und mit 10 µL jeder Fraktion gemischt. Das Auffangen der Fraktionen wurde unterbrochen, sobald die blaue Farbe heller erschien. 10 µL jeder Fraktion wurden als Kontrolle der Fraktionen aufbewahrt.

Den Kontrollen 1 - 5 sowie den Fraktionen 1 - 3 wurden 20 µL *Loading dye* hinzugegeben und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach einer SDS-PAGE wurden die Gele mittels einer Coomassie-Färbung analysiert.

Das eluierte Protein wurde gegen 1 L des Dialysepuffers für 2 h bei 4 °C dialysiert. Danach wurde der Puffer erneut und über Nacht dialysiert.

Das gereinigte Protein wurde mit 10% Glycerol versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

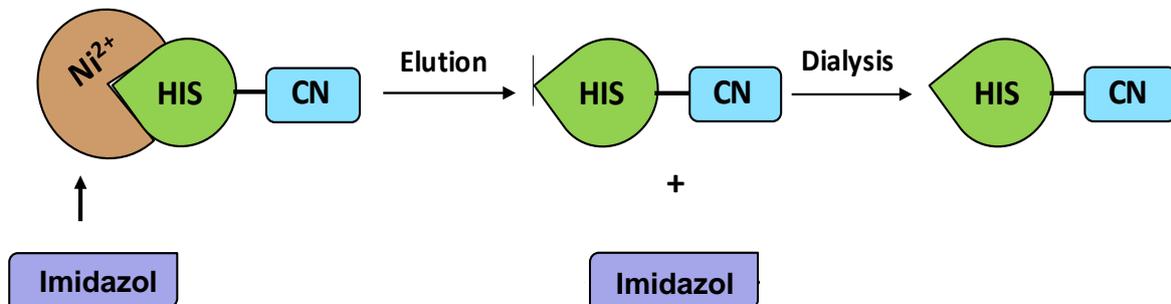


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Protein-Aufreinigung vom His₆-Calcineurin mittels Affinitätschromatographie. Das His-Bindungsharz bindet spezifisch an die Hexa-Histidin-Sequenz im His₆-CNA1-391/CNB1-170 Protein. Das His₆-Fusionsprotein wird nach der Zellyse durch die Bindungsaffinität des Poly-Histidins zu Ni²⁺ an das Harz gebunden. Nach Zugabe eines Imidazol-Überschusses, welches das Poly-Histidin kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt, folgt die Elution. Durch eine Dialyse wird das Imidazol entfernt und das gereinigte His₆-Calcineurin erhalten.

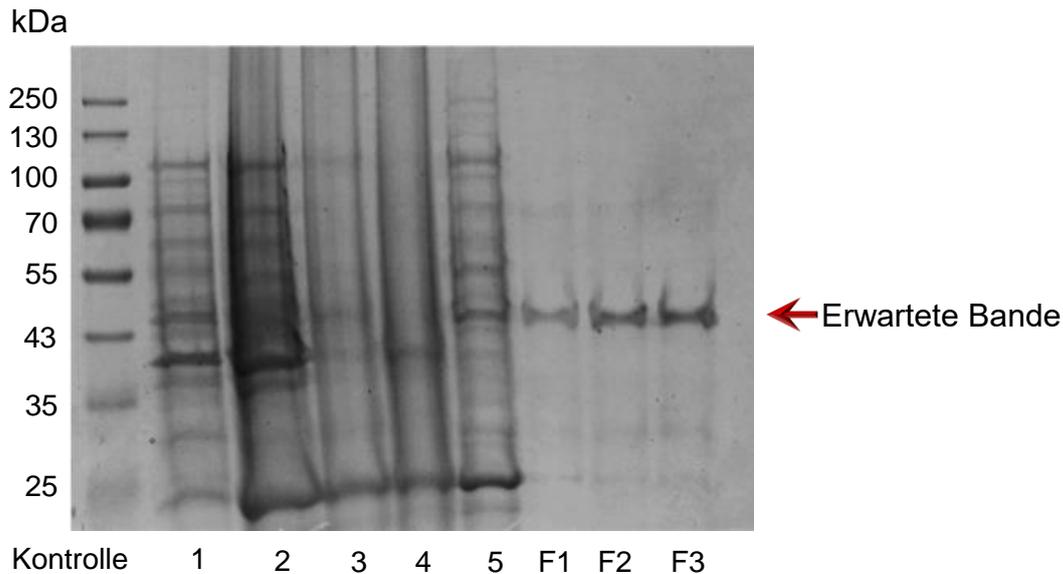


Abbildung 2.9: Exemplarische Aufnahme der bei der Protein-Aufreinigung gesammelten Fraktionen inklusive Kontrollen. Je 30 μ L Endvolumen wurden pro Tasche aufgetragen. Die erwartete Bande ist etwa 45 kDa groß. Kontrolle 1 = Bakteriensuspension vor IPTG-Zugabe; Kontrolle 2 = Bakteriensuspension nach IPTG-Zugabe; Kontrolle 3 = Überstand nach Sonifizierung; Kontrolle 4 = Pellet nach Sonifizierung; Kontrolle 5 = Überstand nach der Inkubation mit dem His-Bindungsharz; F = Fraktionen; kDa = Protein-Molekulargewichtsmarker.

2.2.2.6.b MBP-tagged Fusionssysteme

Die zur Proteinexpression verwendeten Plasmide der DLK wt, DLK L362A, DLK V364A und DLK L362A/V364A wurden, wie in Kapitel 2.2.1.7.b beschrieben, hergestellt.

Die kodierende Sequenz dieser DLK Konstrukte, welche die Aminosäuren 140 - 517 enthalten, ist mit einem MBP-*tag* gefolgt von einer TEV-Spaltungserkennungssequenz fusioniert. Die Expression steht unter der Kontrolle des Lac-Operons und ist durch IPTG induzierbar.

Für die Transformation wurden One Shot® Stbl3™ chemisch kompetente Zellen verwendet.

Alle weiteren Schritte für das Screening und der Proteinreinigung sind dem Abschnitt 2.2.2.5.a.I zu entnehmen.

Die Protein-Aufreinigungen beider Fusionssysteme unterschieden sich in den eingesetzten Puffern und in den Bindungssubstraten. Maltose wurde statt Imidazol eingesetzt. Anstelle von His-Bindungsharzen wurden Amylose-Harze, Agarose-Perlen mit Amylose als Gelmatrix, mit Bindungsaffinität zu MBP verwendet.

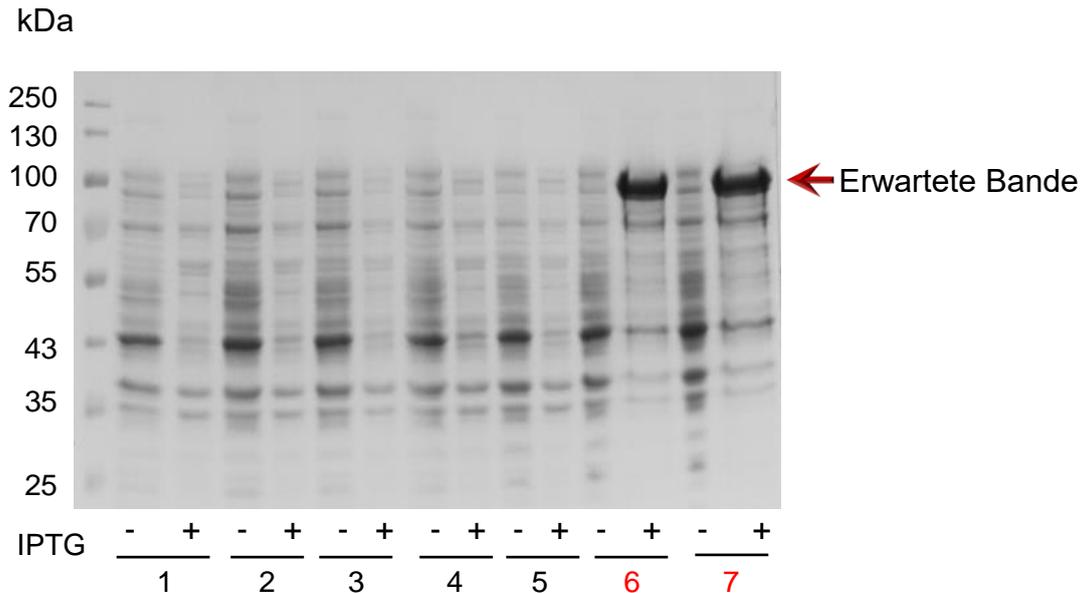


Abbildung 2.10: Exemplarische Aufnahme der beim Screening selektionierten Kolonien. Je 30 μ L Endvolumen wurden pro Tasche aufgetragen. Die erwartete Bande hat ein rechnerisches Molekulargewicht von 94 kDa. IPTG-Zugabe (+). Die gewählten Kolonien (6+7) sind rot dargestellt. kDa = Protein-Molekulargewichtsmarker.

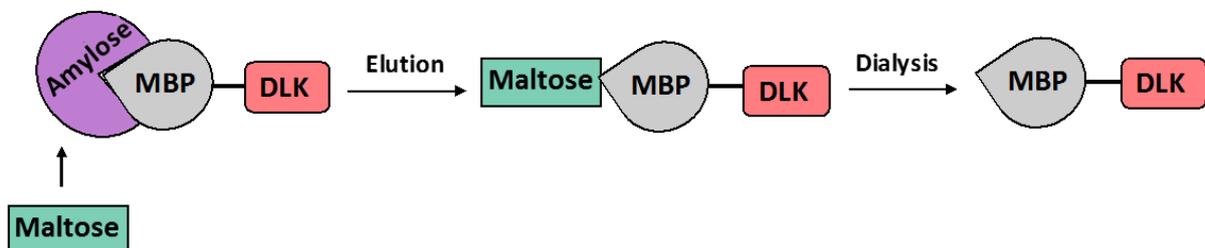


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Proteinreinigung von MBP-TEV-DLK₁₄₀₋₅₁₇ Proteine mittels Affinitätschromatographie. Das Amylose-Harz bindet spezifisch an die MBP-Sequenz im MBP-TEV-DLK-Protein. Das MBP-Fusionsprotein wird nach der Zellyse durch die Bindungsaffinität von MBP zu Amylose an das Harz gebunden. Nach Zugabe eines Überschusses an Maltose, die mit MBP um die Bindung konkurriert, folgt die Elution. Durch Dialyse wird die Maltose entfernt und das gereinigte MBP-DLK-Protein erhalten.

MATERIAL UND METHODEN

Die zur Aufreinigung von MBP-Fusionssysteme verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet:

Extraktionspuffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	0,32 g
NaCl	1 M	5,84 g
EDTA	1 mM	200 µL (0,5 M EDTA)
Nonidet™ P-40	1% (v/v)	1 mL
DTT	1 mM	100 µL (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	1 mL (100 mM Stammlösung)
dH ₂ O		ad 100 mL

Elution-Puffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	0,06 g
NaCl	1 M	1,18 g
EDTA	1 mM	40 µL (0,5 M EDTA)
DTT	1 mM	20 µL (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	200 µL (100 mM Stammlösung)
Maltose	25 mM	0,18 g
dH ₂ O		ad 20 mL

Dialysepuffer

Tris-HCl pH = 8,0	20 mM	3,15 g
NaCl	1 M	58,44 g
EDTA	1 mM	2 mL (0,5 M EDTA)
DTT	1 mM	1 mL (1 M Stammlösung)
PMSF	1 mM	10 mL (100 mM Stammlösung)
dH ₂ O		ad 1 L

2.2.2.7 Protein-Protein Interaktionsassay

Ob eine direkte Interaktion zwischen DLK wt und Calcineurin stattfindet, kann mit einem Protein-Protein Interaktionsassay festgestellt werden. Hierzu wurden MBP-Fusion-DLK (wt, L362A, V364A, L362A/V364A) und His₆-tag Calcineurin in den Interaktionsassay eingesetzt (Abbildung 2.12).

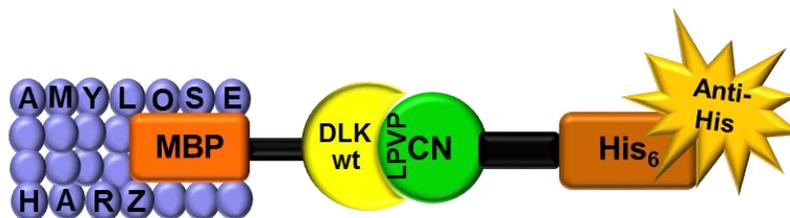


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Protein-Protein Interaktion: Die MBP-DLK Fusionsproteine wurden an Amylose-Harzen immobilisiert. Die Interaktion zwischen den MBP-DLK Fusionsproteinen und dem His₆-markierten Calcineurin wurde mittels eines Immunoblots unter Verwendung eines Anti-His₆-Antikörpers nachgewiesen. Findet keine Interaktion der MBP-DLK Mutanten mit Calcineurin statt, ist keine Immundetektion möglich.

Die verwendeten Puffer werden hier aufgelistet:

Interaktionspuffer (PI-Puffer)*

NaCl	150 mM	0,88 g
MgCl ₂	5 mM	0,05 g
Triton X-100	1% (v/v)	1 mL
Nonidet™ P-40	0,5% (v/v)	500 µL
DTT	1 mM	100 µL (1 M Stammlösung)
cOmplete™	1 x	(Nach Herstelleranweisung)
Tris-HCl pH = 7,5	50 mM	ad 100 mL

Blockpuffer*

BSA	1 mg/mL	20 mg
PI-Puffer		ad 20 mL

*Beide Puffer wurden frisch zubereitet und auf Eis gehalten.

200 µL des Amylose-Harzes wurden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, dreimal mit 500 µL PI-Puffer gewaschen und stets bei 4 °C und 500 U/min für 1 min zentrifugiert. Dem Waschvorgang schloss sich eine dreißigminütige Inkubation mit 500 µL Blockpuffer auf einem Überkopf-Rotator (Heidolph RZR1) bei 4 °C. Die Suspension wurde anschließend gleichmäßig auf sechs 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt.

5 µg der MBP-DLK Fusionsproteine (wt, L362A, V364A, L362A/V364A) wurden hinzugegeben und bei 4 °C für 60 min auf einem Überkopf-Rotator inkubiert.

Anschließend wurde das Harz dreimal mit 500 µL Blockpuffer gewaschen und in 80 µL Blockpuffer erneut suspendiert. 2 µg des Interaktionspartner-Proteins (Calcineurin) wurden zu jedem Reaktionsgefäß hinzugegeben und bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotator für 120 min inkubiert.

Anschließend wurden die Harze achtmal mit 500 µL PI-Puffer bei 8 °C im Thermomixer für 10 min gewaschen und jedes Mal bei 4 °C und 500 U/min für eine 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Harz in 40 µL *Loading dye* aufgenommen und die Proteine bei 95 °C für 8 min denaturiert.

Die Proben wurden mittels einer SDS-PAGE mit anschließender Immundetektion unter Verwendung eines Anti-His₆-Antikörpers analysiert. Als Bezugsgröße wurde ein anti-MBP-Antikörper verwendet, um zu kontrollieren, ob gleiche Mengen an immobilisierten MBP-DLK Proteine eingesetzt wurden. 5% des eingesetzten Calcineurin-Fusionsproteins (0,1 µg) wurden als Input-Kontrolle verwendet.

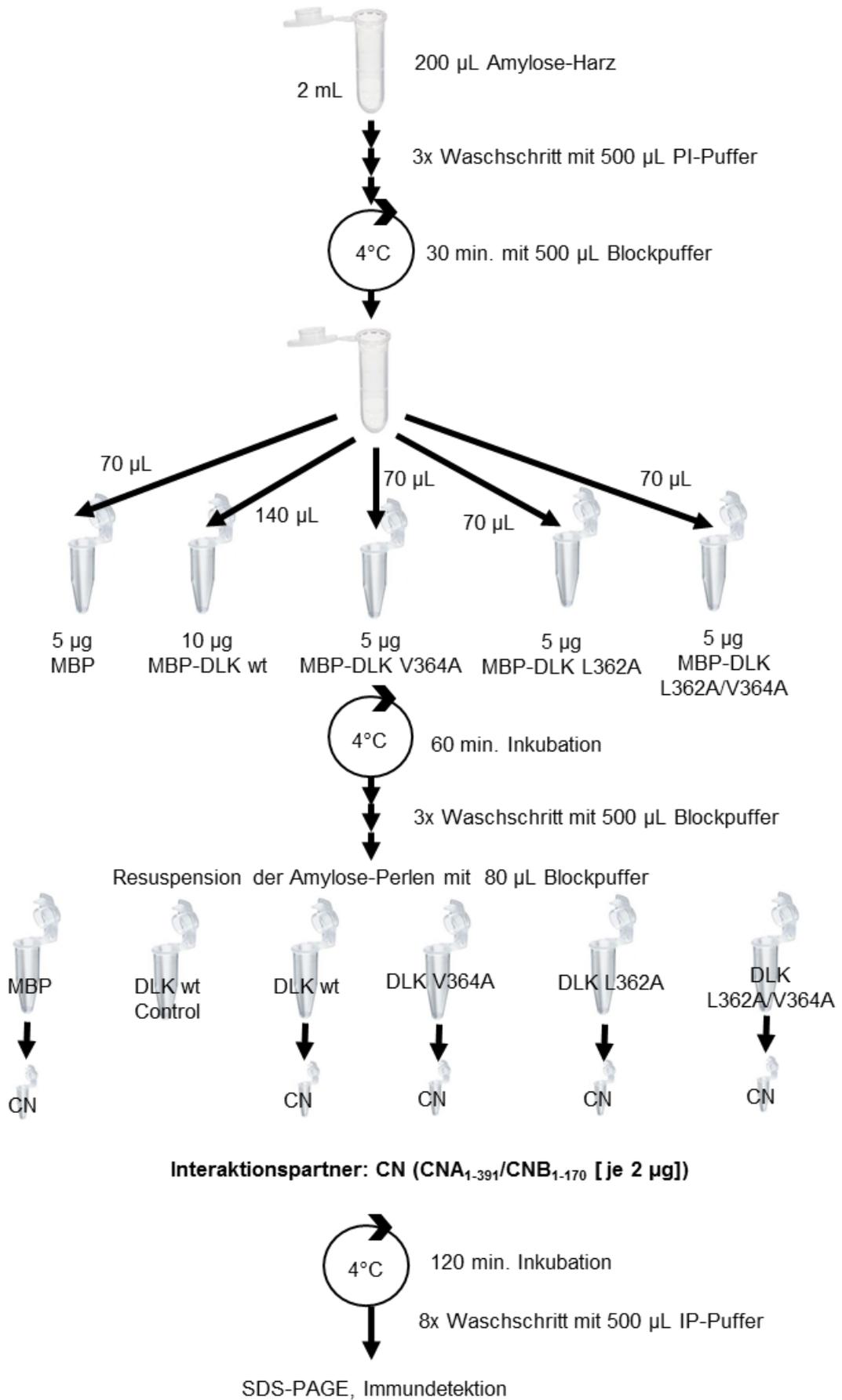


Abbildung 2.13: Fließschema zur Protein-Protein Interaktion.

2.2.2.8 Konkurrenz-Assay mit Oligopeptiden

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der Interaktion zwischen DLK und Calcineurin über die LxVP-Interaktionsdomäne wurde ein Konkurrenz-Assay mit synthetisch hergestellten LxVP-basierten Peptiden durchgeführt. Die 15-mer LxVP-Peptide wurden von Claudia Wackendorff aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Maison (Institut für Pharmazie, Hamburg) als Acetyl-geschützte Amide synthetisiert und lyophilisiert. Es handelte sich um folgende Aminosäuresequenzen:

DLK wt: Ac-G-S-N-S-L-H-L-P-V-P-S-S-C-P-D-CONH₂ (Mr = 1550,69 g/mol)

DLK V364A: Ac-G-S-N-S-L-H-L-P-**A**-P-S-S-C-P-D-CONH₂ (Mr = 1522,64 g/mol)

Scrambled: Ac-L-H-N-P-D-G-P-S-S-V-C-S-P-L-S-CONH₂ (Mr = 1550,69 g/mol)

Pro Peptid wurden 8 mg hergestellt. Die Gesamtmenge wurde in 100 µL PI-Puffer gelöst und als 10 µL Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

Für das Konkurrenz-Assay wurden analog zur Protein-Protein Interaktion 2 µg des Calcineurin- und 5 µg des DLK wt-Fusionsproteins eingesetzt.

2 µg Calcineurin₁₋₃₉₁ entspricht einer Menge an Protein pro Aminosäure von 5,13 ng/aa. 77 ng/aa an 15-mer Peptid sind entsprechend für ein 1:1 Verhältnis erforderlich. Um das an der DLK interagierende Calcineurin zu verdrängen, wurde ein 10-facher Überschuss an Peptiden pro Ansatz gewählt.

Vier 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit je 2 µg des Calcineurin-Fusionsproteins und die 10-fache Menge des entsprechenden Peptids wurden wie folgt vorbereitet:



Die Mischungen wurden bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotator für 120 min inkubiert.

Währenddessen wurden 200 µL des Amylose-Harzes in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit 500 µL PI-Puffer im Thermomixer gewaschen. Nach den Waschschrritten wurde das Harz in 300 µL Blockpuffer

aufgenommen und auf einem Überkopf-Rotator bei 4 °C für 30 min inkubiert. 20 µg des MBP-DLK wt Fusionsproteins wurden hinzugegeben und bei 4 °C auf einem Oberrotator für 60 min erneut inkubiert. Das Harz wurde anschließend dreimal mit 500 µL Blockpuffer gewaschen und in 300 µL Blockpuffer erneut suspendiert.

70 µL dieser Harz-Suspension wurden jeweils zu den Interaktionspartner-Mischungen (CN mit und ohne Peptide) hinzugegeben und bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotator für 120 min inkubiert. Anschließend wurden die Harze entsprechend der Protein-Protein Interaktion (Kapitel 2.2.2.7) behandelt und analysiert.

2.2.3 Arbeiten mit HIT-T15 und JEG-3 Zellen

2.2.3.1 Transiente Transfektionen

Die transiente Transfektion mittels des Transfektion-Reagenzes Metafectene® wurde zur Analyse der Wirkung von überexprimierten Proteinen in HIT-T15 und JEG-3 Zellen verwendet. Metafectene® komplexiert die Fremd-DNA in kompakte Strukturen und fördert deren Aufnahme in die Zelle.

Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde vor dem Ausplattieren der Zellen in ein steriles 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Menge an serum- und antibiotikafreiem RPMI- oder DMEM-Medium gegeben. In ein zweites steriles 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde pro µg Plasmid-DNA die doppelte Menge an Metafectene® in µL gegeben und mit RPMI- oder DMEM-Medium entsprechend aufgefüllt. Beide Lösungen wurden durch Auf- und Ab-Pipettieren gründlich gemischt. Anschließend wurde die Plasmid-Lösung auf die Metafectene®-Lösung pipettiert und bei RT für 20 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgte das Ausplattieren der Zellen. Zum Schluss wurde das Gesamtvolumen der Plasmid-Metafectene®-Mischung auf die ausgesäten Zellen gegeben und im Brutschrank für 48 h inkubiert.

Je nach Zweck der Transfektion wurden die konfluent bewachsenen 15 cm Zellkulturplatten (30 - 50 x 10⁶ Zellen) wie folgt ausplattiert:

- **Immuncytochemie:** 100000 - 150000 HIT-T15 Zellen oder JEG-3 Zellen wurden auf einem Deckgläschen (Ø 13 mm) in einer 12-well-Kulturplatte in einem 1 mL Volumen des entsprechenden Komplettmediums ausgesät. Für eine Lebendfärbung wurden 150000 HIT-T15 Zellen auf gekammerte

Objektträger ausplattiert. Anschließend wurde der Transfektionskomplex (Plasmid-DNA und Metafectene[®]) auf die ausgesäten Zellen gegeben.

- **Expressionsanalyse/Luciferase-Reportergen-Assay:** HIT-T15 Zellen wurden in 6-*well*-Kulturplatten so ausplattiert, dass eine Zelldichte von etwa 2×10^6 Zellen pro *well* in einem 2 mL RPMI-Komplettmedium erreicht wurde. Bei den JEG-3 Zellen wurde auf einer 6-*well*-Kulturplatte eine Zelldichte von etwa 1×10^6 pro *well* in 2 mL DMEM-Komplettmedium eingestellt. Anschließend wurde der Transfektionskomplex (Plasmid DNA und Metafectene[®]) auf die Zellen hinzugegeben.

2.2.3.2 Immuncytochemie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation und β -Zell-Apoptose wurden die HIT-T15 Zellen nach transients Transfektion mit DLK wt und der DLK Mutanten (DLK K185A, DLK NES, DLK V364A) immuncytochemisch mittels einer Immunfluoreszenz analysiert. Mit den JEG-3 Zellen wurde nur die subzelluläre Lokalisation des transient transfizierten DLK wt und der DLK NES Mutante untersucht, um den Effekt der endogenen DLK-Aktivität auszuschließen.

48 h nach der transienten Transfektion wurden die Zellen je nach Experiment entweder vor der Ernte unbehandelt oder mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) für 60 min, mit CsA (10 μM) für 30 min, FK506 (167 nM) für 30 min oder mit H_2O_2 (100 μM) für 10 min behandelt.

Anschließend wurden die Deckgläschen (\varnothing 13 mm) in den 12-*well*-Kulturplatten mit 1 mL 1x PBS bei RT für 5 min gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 mL eiskaltem Methanol (-20 °C) für 10 min fixiert und dann dreimal mit 1 mL 1x PBS für 5 min gewaschen. Um die Autofluoreszenz zu reduzieren, wurden die Zellen mit 1 mL 0,1% Natriumborhydrid-Lösung für 5 min inkubiert. Hiernach wurden die Zellen erneut dreimal mit 1 mL 1x PBS für 5 min gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungen des primären Antikörpers durch die Inkubation mit 1 mL Blockpuffer für 45 min bei RT blockiert. Danach wurden die Deckgläschen einmal mit 1 mL 1x PBS gewaschen und mit 60 μL der primären Antikörper (auf Parafilm) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen erneut in die 12-*well*-Platte überführt und dreimal mit 1 mL 1x PBS für 5 min gewaschen. 60 μL des sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurden auf Parafilm pipettiert, die Deckgläschen

auf den Tropfen gelegt und lichtgeschützt bei RT für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit einem Tropfen DAPI-Mounting-Medium (4', 6-diamino-2-phenylindol, ROTH®) auf einem Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden lichtgeschützt für mindestens 24 h getrocknet. Die Detektion der Immunfluoreszenz wurde mithilfe eines konfokalen Mikroskops (*Zeiss Axio Observer.Z1*) bei einer 40-fachen Vergrößerung des Objektivs analysiert.

Mit der Software (*ZEN 2 blue edition*) wurden je Deckgläschen 20 Aufnahmen mit 10 - 20 Zellen pro Bild aufgenommen. In jeder Untersuchungsgruppe wurden ca. 300 Zellen jeweils in Doppelbestimmung analysiert.

Alle hier untersuchten DLK-Konstrukte besitzen eine N-terminale Erkennungsstruktur (M2-Flag), um die transient transfizierten Zellen zu identifizieren.

Durch die DNA-Kernfärbung (DAPI) wurde die Gesamtheit der Zellen (untransfiziert und transfiziert) gezählt und die transient transfizierten Zellen mit der subzellulären DLK-Lokalisation (Anti-Flag® M2, rote Fluoreszenz) als Prozentsatz der transfizierten Zellen ausgedrückt.

Zur Bestimmung der β -Zell Apoptose wurden die mit einem Antikörper gegen die fragmentierte Caspase-3 gefärbten positiven Zellen (grüne Fluoreszenz) gezählt und als Prozentsatz der Zellen, welche das M2-markierte Epitop der DLK-Konstrukte exprimierten, ausgedrückt.

Für die Lebendfärbung wurden 48 h nach der Transfektion mit dem Expressionsvektor für die cAMP-Bindungsstelle von EPAC2 (flankiert von YFP und CFP) die HIT-T15 Zellen in den gekammerten Objektträger entweder ohne oder mit 10 ng/mL TNF α (*recombinant, human*) für 60 min behandelt. Hiernach wurde das Medium abgesaugt und je 1 mL 1x PBS hinzugegeben. Draq5 (1,5-bis{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione, Cell Signaling) wurde in einer Konzentration von 1:1000 (5 μ M) in das PBS hinzugegeben und die Zellen wurden bei RT für 15 min lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde das Draq5/PBS-Medium abgesaugt, frisches 1x PBS dazugegeben und die Zellen sofort mittels eines konfokalen Mikroskops analysiert.

Es folgte eine quantitative Auswertung der aufgenommenen Bilder einschließlich Identifikation der mit dem cAMP-EPAC2-CFP/YFP-Sensor transient transfizierten Zellen.

MATERIAL UND METHODEN

Die HIT-T15 Zellen, welche mit dem cAMP-EPAC2-CFP/YFP-Sensor transient transfiziert wurden, zeigten eine gelbe Fluoreszenz (YFP).

Für jede Messung der Immunfluoreszenz wurde das konfokale Mikroskop wie folgt eingestellt:

Pinhole: 200 (1AU max)
Gain (master): 500
Digital Offset: -0,06
Digital Gain: 1

Tabelle 2.8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper zur immunocytochemischen Färbungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung (1%BSA/PBS)
Anti-Flag® M2 (Maus)	Sigma-Aldrich	1:2000
Cleaved Caspase-3 (Rabbit)	Cell Signaling Technology	1:50
DLK (Rabbit)	Holzmann et al., 1994 Fan et al., 1996	1:50
Draq5	Cell Signaling Technology	1:1000
GFP (Rabbit) (für YFP)	Abcam	1:500
AlexaFluor488 Anti-Rabbit	Invitrogen	1:50
DAPI-Mount Fluor Care	ROTH®	
TRITC Anti-Maus	Invitrogen	1:50

Natriumborhydrid-Lösung 0,1%

Natriumborhydrid 0,05 g
1x PBS ad 50 mL

Bovine Serum Albumine (BSA) 1%

BSA	0,01 g
1x PBS	ad 100 mL

Blockpuffer

BSA	5%	5,00 g
Triton X-100	0,3%	300 µL
1x PBS		ad 100 mL

2.2.3.3 Luciferase-Reportergen-Assay

Der Luciferase-Reportergen-Assay diente der Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität eines Promotors. Nur wenn der Promotor aktiviert wird und folglich die Transkription startet, kann das Enzym Luciferase exprimiert werden. Die Luciferase-Expression führt zu der Umsetzung der im Puffer enthaltene Komponente Luciferin zu Oxyluciferin und das dabei erzeugte Lichtsignal wird quantitativ mittels eines Luminometers (560 nm) in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Das Lichtsignal ist dabei proportional zur Luciferase-Expression und folglich zur Promotoraktivität (de Wet et al.,1987).

Um die CRE-, CREB-, c-Jun- und c-fos-abhängigen Gentranskription zu untersuchen, wurden die entsprechenden Luciferase-Reportergene 4xSomCRE (für CRE), pG5E1B-Luc (für CREB, c-Jun) und c-fos in HIT oder JEG Zellen transient transfiziert. Die Expressions-Vektoren für GAL4-CREB, GAL4-c-jun, DLK wt, DLK K185A, DLK CN1, DLK CN2, DLK CND, DLK L362A, DLK L362R, DLK W334A, DLK Y343A, DLK Y343F, DLK V364A und DLK NES wurden je nach Fragestellung kotransfiziert. Der Leervektor pBluescript (BS, Bluescript) wurde zu jedem Experiment kotransfiziert, um die eingesetzten Plasmid-DNA-Mengen auszugleichen.

Um die Transfektion-Effizienz zu korrigieren, wurde ein GFP-Reportergen unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (GFPtpz), welches für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, kotransfiziert.

Kratzpuffer, pH 7,6

NaCl	150 mM	15 mL (5 M NaCl)
EDTA	1 mM	1 mL (0,5 M EDTA)
Tris	40 mM	20 mL (1 M Tris-HCl, pH 7,5)
dH ₂ O		ad 500 mL

Kaliumphosphatpuffer (100mM), pH 7,8

K ₂ HPO ₄	100 mM	500 mL
KH ₂ PO ₄	100 mM	x (zur Einstellung auf pH 7,8; etwa 40 mL)
DTT	1 mM	x (1 M Stammlösung)*

*Nach Einstellung des Endvolumens

Glycylglycin Puffer, pH 7,8

Glycylglycin	25 mM	330 mg
MgSO ₄	15 mM	180 mg
EGTA	4 mM	40 mL (10 mM EGTA)
dH ₂ O		ad 100 mL

Luciferin Stammlösung, -80 °C

DTT	10 mM	275 mg
D-Luciferin	1 mM	50 mg
Glycylglycin Puffer		ad 180 mL

→ 1,2 mL Aliquots (Lichtgeschützt)

Luciferase-Assay-Mix* (30 Proben)

Kaliumphosphatpuffer	16,5 mM	780 µL
ATP	2,2 mM	52 µL (200 mM Stammlösung)
DTT	1,1 mM	5,2 µL (1 M Stammlösung)
Glycylglycin Puffer		ad 4,74 mL (ca. 3,9 mL)

Luciferin-Mix*, lichtgeschützt

Glycylglycin Puffer		2 mL
Luciferin Stammlösung		500 µL
DTT	7,9 mM	20 µL (1 M Stammlösung)

*Frisch vor Gebrauch herzustellen

2.2.3.3.a Behandlung und Ernte der Zellextrakte

48 h nach der transienten Transfektion wurden die Zellen je nach Experiment 6 h vor der Ernte mit 40 mM KCl, mit 10 μ M Forskolin oder mit beiden behandelt. Ferner wurden die Zellen je nach Fragestellung mit 10 ng/mL TNF α für 60 min, 30 nM CsA für 30 min oder mit 1 nM FK506 für 30 min behandelt. Für die Zellernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 mL 1x PBS gewaschen und mit einem Gummizellschaber in 1 mL Kratzpuffer geerntet. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 6.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 μ L Kaliumphosphatpuffer (mit 1 mM DTT) erneut suspendiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Gefrieren im flüssigen Stickstoff und dreimaliges Auftauen im Wasserbad (37 °C) lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate bei 4°C und bei 14.000 U/min für 3 min zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet oder bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3.b Messung der Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität

Auf einer weißen 96-well-Platte wurden 20 μ L jeder Probe mit 145 μ L Luciferase-Assay-Mix gemischt. Die Luciferase-Aktivität wurde nach Zugabe von 80 μ L Luciferin-Mix mittels eines Luminometers (Centro LB 960 Luminometer) für 10 s gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Die Messung der Lichtemission erfolgte bei 560 nm und als Hintergrundsignal wurde der vom Zellextrakt freie Kaliumphosphatpuffer verwendet.

2.2.3.3.c Messung der GFP-Reporter-Gen-Aktivität

Die Kotransfektion mit dem GFP-Reporter-Gen (GFPtpz-CMV) wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz eingesetzt. GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, welches aus der Qualle *Aequorea Victoria* isoliert wird. Das hier verwendete Reporter-Gen besitzt 4 Punktmutationen, welche das Emissionsspektrum von 504 nm auf 527 nm verschieben.

Die Messung der Fluoreszenz wurde vor der Luciferase-Aktivitätsmessung, auf derselben weißen 96-well-Plate durchgeführt. Als Leerwert wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet. Hierfür wurde der FluoroCount® Microplate Fluorometer verwendet. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Messung

erfolgte bei 530 nm (Emission) für 1 s. Das Gerät lieferte Messwerte in Fluoreszenzeinheiten (RFU).

Die Luciferase-Messwerte wurden auf die RFU-Werte normiert.

2.2.4 Herstellung transgener Mäuse

2.2.4.1 Generierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse (β -DLK^{-/-})

Das konstitutive globale Ausschalten des DLK-Gens führt zum perinatalen Tod in Mäusen (Hirai et al., 2006; Itoh et al., 2011). Deswegen ist die Generierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen für die Untersuchung DLK-funktion in den pankreatischen β -Zellen unausweichlich. Diese Spezifität für die β -Zelle stellt das beste Modell dar, um den Beitrag der DLK für die Entstehung des Diabetes Mellitus Typ 2 zu erforschen.

2.2.4.1.a Herstellung transgener chimären Mäuse mit dem targeting-Vektor für DLK

Der *targeting*-Vektor für die Generierung dieser Mäuse wurde vom *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC) käuflich erworben (Abbildung 2.14).

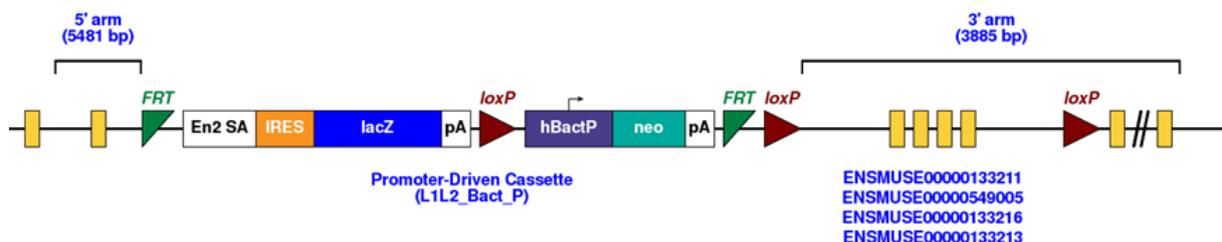


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des *targeting* Knock-out Vektors für DLK (EUCOMM:MAP3K12). Die Exons 3, 4, 5 und 6 sind von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Die artifizielle bakterielle Kassetten ist von zwei FRT-Erkennungssequenzen flankiert und zwischen Exon 2 und 3 eingeführt. En2 SA: En2 Splice-Akzeptor; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; lacZ: lacZ Reporter gen; pA: Poly-A-Signal; hBactP: autonomer Promotor; neo: Neomycin-Gen; FRT: Erkennungssequenzen für die Flippase (Flp)-Recombinase; loxP: Erkennungssequenzen für die *cyclization recombinase* (Cre)-Recombinase.

Das Cre/loxP-System und das Flp/FRT-System fanden Anwendung, wobei die FRT-Erkennungssequenzen nur die Neomycin-Selektionskassette flankiert, um durch die Flp-Recombinase entfernt zu werden.

Die Herstellung der gentechnisch veränderten Tiere fand in Kooperation mit der ZMNH Core Facility für transgene Tiere (PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) statt.

C57BL/6N (braune Maus) embryonale Stammzellen (ES-Zellen, JM8A3) wurden mittels Elektroporation mit dem *targeting*-Vektor transfiziert. Bei einigen der transfizierten ES-Zellen wurde durch homologe Rekombination das veränderte Gen anstelle des ursprünglichen Gens im Chromosom integriert. Mit Neomycin als Selektionsmarker wurden die veränderten ES-Zellen durch die Anwesenheit des Neomycin-Resistenzgens in der eingeführten artifiziellen Kassette gepickt. Zwei Klone (B03 und F04) wurden je in die Blastozyste von C57BL/6J Mäusen (schwarze Maus) injiziert. Die Blastozysten besitzen zwei Arten von Stammzellen, die ursprünglichen ES-Zellen der C57BL/6 Maus und die veränderten ES-Zellen der C57BL/6N Maus. Die Blastozysten wurden in den Uterus einer weiblichen scheinchwangeren Maus implantiert und Chimären (braune/schwarze Mäuse) erzeugt (Abbildung 2.15).

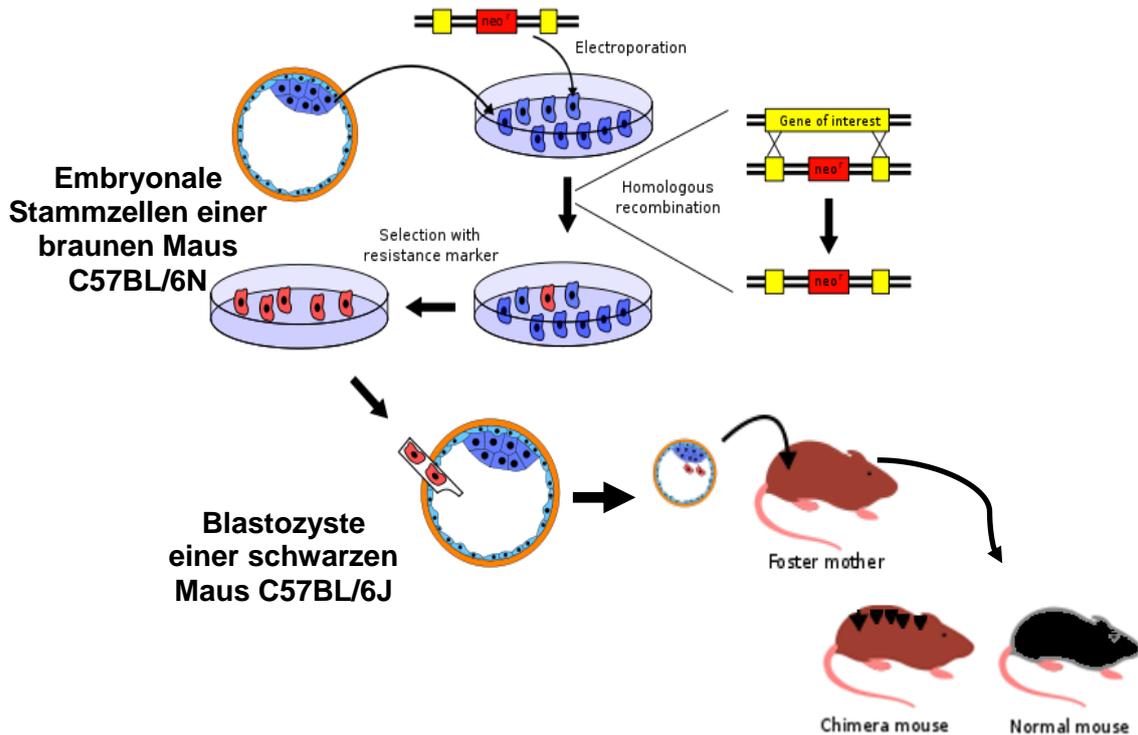


Abbildung 2.15: Das Verfahren zur Herstellung von Knock-out Mäusen (mod. Wikipedia, the free encyclopedia). ES-Zellen (JM8A3) einer braunen Maus werden entnommen, mittels Elektroporation mit dem *targeting*-Vektor transfiziert und nach homologer Rekombination durch Neomycin als Selektionsmarker selektiert. Abschließend werden die veränderten ES-Zellen in die Blastozyste einer schwarzen Maus injiziert und in den Uterus einer scheinchwangeren Maus implantiert. Die Nachkommenschaft dieser Maus ergibt Chimäre transgene Mäuse sowie Mäuse aus dem Hintergrund der schwarzen Maus.



Abbildung 2.16: Chimäre transgene Mäuse: Einige Teile des Körpers resultieren aus den ES-Zellen der braunen Maus (C57BL/6N) und anderen Teilen aus der C57BL/6 Maus. Exemplarische Aufnahmen zwei männlicher Chimären; der überwiegende braune Pelz ergibt sich aus den mit dem *targeting*-Vektor transfizierten ES-Zellen.

2.2.4.1.b Verpaarungsschemata der Mäuse zur Generierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-})

Die Mäuse wurden in jedem Schritt mittels PCR einem Genotyp zugeordnet. Die An- oder Abwesenheit verschiedener Gene oder Erkennungssequenzen wurden nach jeder Verpaarung mit den in Tabelle 2.4 aufgeführten Primer bestimmt (Kapitel 2.2.1.7.c).

Die männlichen Chimären Mäuse wurden zunächst mit weiblichen Wildtypen (+/+) verpaart. Dies diente als Nachweis zum Keimbahntransfer (Abbildung 2.17). Die Neugeborenen wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der Selektionskassette (Neomycin = neo, positiv) und der loxP-3'-Erkennungssequenz (gefloxt = flox, positiv) überprüft (Abbildung 2.18).

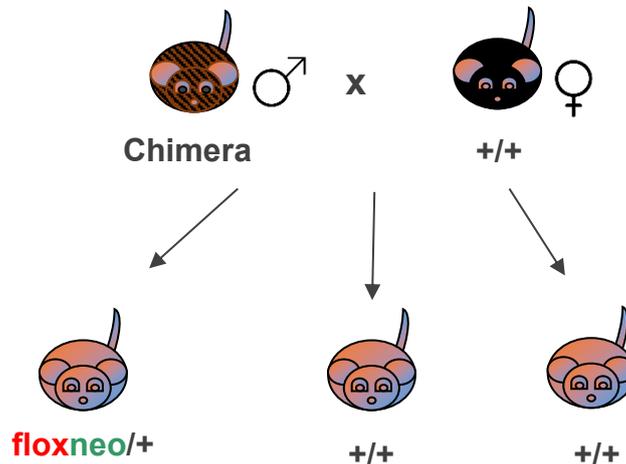


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt I (mod. Transgene Tiere, ZMNH): Chimäre Böcke wurden mit Wildtyp Weibchen (+/+) verpaart. Neugeborene: floxneo/+ (gefloxt+Kassette/Wildtyp); +/+ (Wildtyp).

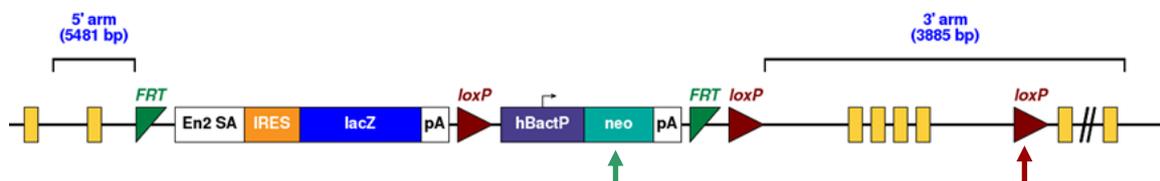


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung, Genotypisierung I: PCR-Nachweis der Neomycin-Selektionskassette (Pfeil grün) und der loxP-3'-Erkennungssequenz (Pfeil rot) mit den entsprechenden Primer.

Im nächsten Schritt wurden die floxneo/+ Mäuse aus dem Verpaarungsschritt I mit Mäusen verpaart, welche die Flippase (Flp)-Recombinase konstitutiv exprimieren, sog.

Flip-Deleter. Die Flp-Recombinase erkennt die FRT-Erkennungssequenzen und recombiniert das FRT-flankierte DNA-Fragment. Dadurch kommt es zur Entfernung der Neomycin-Selektionskassette (Abbildung 2.19). Die Neugeborenen wurden mittels PCR auf die Abwesenheit der Selektionskassette (Neomycin = neo, negativ) und auf die Anwesenheit der loxP-3'-Erkennungssequenz (gefloxt = flox, positiv) und der Flp-Recombinase (Flippase = Flp, positiv) überprüft (Abbildung 2.20).

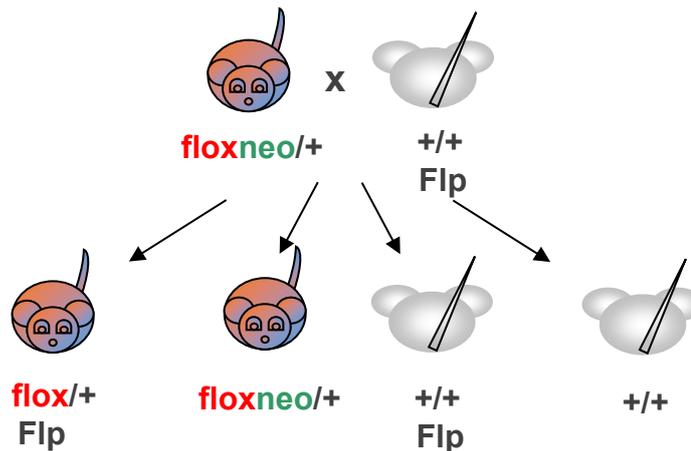


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt II (mod. Transgene Tiere, ZMNH): $floxneo/+$ Mäuse wurden mit Flp-Deleter Mäusen ($+/+ Flp$) verpaart. Neugeborene: $flox(Flp)/+$ (gefloxt+Flp/Wildtyp); $floxneo/+$ (gefloxt+Kassette/Wildtyp); $+/+ Flp$ (Wildtyp Flp); $+/+$ (Wildtyp).

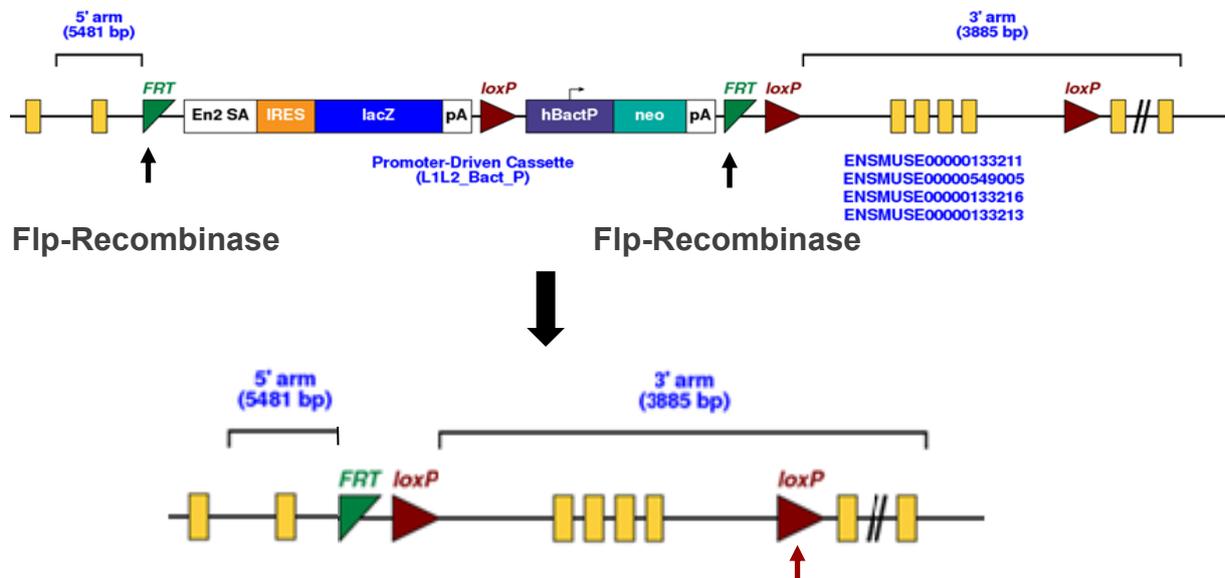


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung, Deletion der Neomycin-Selektionskassette und Genotypisierung II: Die Flp-Recombinase erkennt die FRT-Erkennungssequenzen (Pfeile schwarz) und entfernt Neomycin-Selektionskassette. Eine FRT-Erkennungssequenz verbleibt. PCR-Nachweis der Anwesenheit der Flp-Recombinase und der loxP-3'-Erkennungssequenz (Pfeil rot) sowie der PCR-Nachweis auf die Abwesenheit der Neomycin-Selektionskassette.

Eine immunhistologische DAB-Färbung mithilfe eines Antikörpers gegen die β -Galactosidase auf Pankreasparaffinschnitten soll Auskunft über die An- oder Abwesenheit der Selektionskassette geben. In der Selektionskassette befindet sich das LacZ-Gen, welches für die β -Galactosidase kodiert. Mäuse, welche die Selektionskassette besitzen, werden als LacZ⁺ bezeichnet und Mäuse, bei denen die Selektionskassette entfernt wurde, als LacZ⁻.

Bei den LacZ⁻ Mäusen ist die immunhistologische Färbung mittels Antikörper gegen die β -Galactosidase viel schwächer als bei den LacZ⁺ Mäusen (Abbildung 2.21). Die schwache Färbung ist auf die endogene Aktivität der β -Galactosidase im Pankreas zurückzuführen.

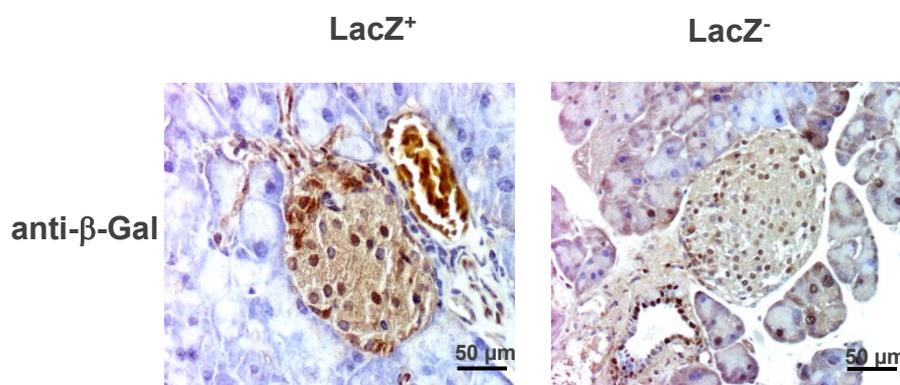


Abbildung 2.21: Konstitutive Expression der bakteriellen β -Galactosidase (β -Gal) Aktivität in Langerhans'chen Inseln der LacZ⁺ Mäusen: Exemplarische Aufnahmen einer DAB-Färbung des Pankreas mit dem Antikörper gegen β -Galactosidase (1:100) auf 3 μ m Paraffinschnitte von LacZ⁺ (links) und LacZ⁻ (rechts) Mäusen.

Im Verpaarungsschritt III wurden die flox (Flp)/+ Mäuse mit Mäusen verpaart, welche die *cyclization recombinase* (Cre)-Recombinase entweder unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten Cytomegalo-Virus-Promotors (CRE GIOB) oder unter der Kontrolle des Ratteninsulin-2-Promotors (CRE RIP) (Herrera, 2000) konstitutiv exprimieren.

Die Cre-Recombinase erkennt die loxP-Erkennungssequenzen und recombiniert das loxP-flankierte DNA-Fragment. Es kommt zur Deletion der Exons 3 - 6 des DLK-Gens in einem Allel (Abbildung 2.23). Durch die Verpaarung mit dem Wildtyp Cre-Deleter (+/+ Cre) verlieren die flox(flP)/+ Mäuse die Flp-Recombinase und ein Wildtyp-Allel des DLK-Gens wird beibehalten (heterozygoter Zustand). Die erzeugten Mäuse sind

heterozygot DLK-KO (Abbildung 2.22). Die Neugeborenen wurden mittels PCR auf die Abwesenheit der Flp-Recombinase (Flippase = Flp, negativ) sowie auf die Anwesenheit der Cre-Recombinase (Cre, positiv) überprüft. Der Nachweis der loxP-3'-Erkennungssequenz ist vom verwendeten Cre-Deleter abhängig. Nachkommen der Cre GLOB-Deleter besitzen keine loxP-3'-Erkennungssequenz mehr im Allel (flox negativ), während Nachkommen der Cre RIP-Deleter aufgrund der β -zellspezifischen Deletion durch den Promotor die loxP-3'-Erkennungssequenz in restlichem Gewebe (z.B. Schwanzspitze) besitzen. Da der oben erwähnte PCR-Nachweis nicht ausreichend ist, um die flox(Cre)/+ (heterozygot DLK-KO) von der +/+ Cre (homozygot Wildtyp Cre) zu unterscheiden, wurde eine weitere PCR durchgeführt, um die Heterozygotie bzw. Homozygotie nachzuweisen. Hierbei wurden Primer designt, welche entweder mit der Sequenz innerhalb der Exone 2, 5 oder 7 hybridieren und je nach verwendetem Cre-Deleter (CRE GLOB oder CRE RIP) die Hetero- und Homozygotie nachgewiesen wurde (Abbildung 2.23 und Abbildung 2.25).

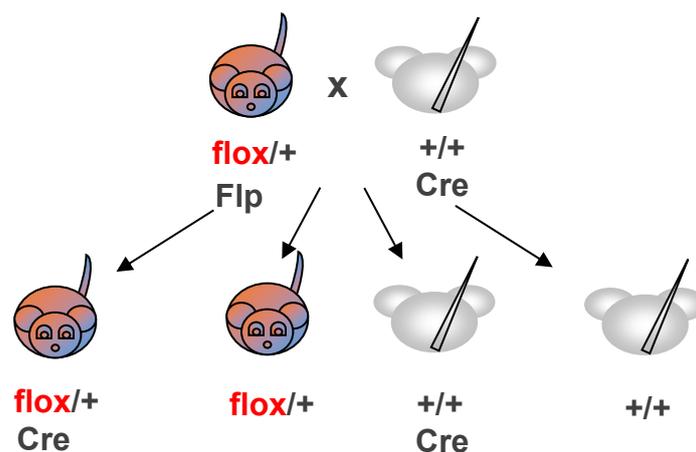


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung, Verpaarungsschritt III (mod. Transgene Tiere, ZMNH): flox(flp)/+ Mäuse wurden mit Cre-Deleter Mäusen (+/+ Cre) verpaart. Neugeborene: flox(Cre)/+ (DLK-KO (Cre)/Wildtyp); flox/+ (gefloxt/Wildtyp); +/+ Cre (Wildtyp Cre); +/+ (Wildtyp).

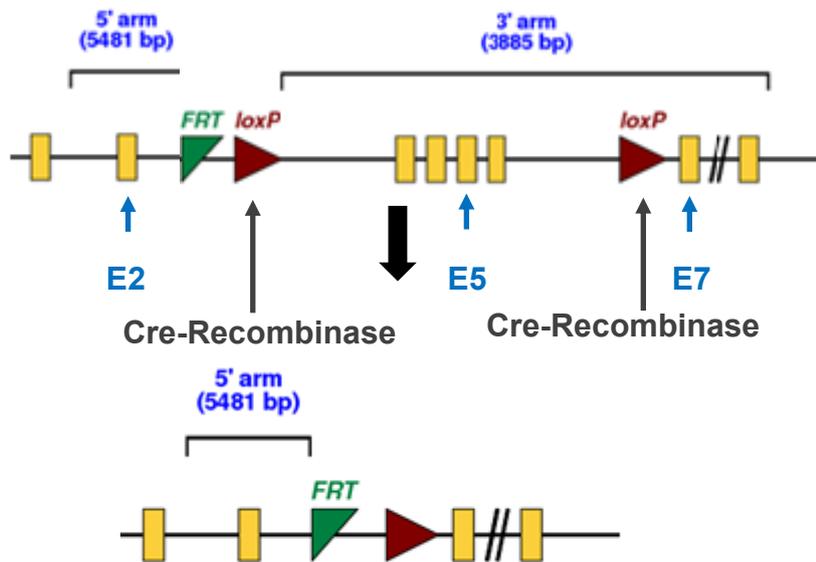


Abbildung 2.23: Schematische Darstellung, Deletion der Exone 3 - 6 des DLK-Gens in einem Allel und Genotypisierung III: Die Cre-Recombinase erkennt die loxP-Erkennungssequenzen (Pfeile schwarz) und entfernt die flankierten Exone 3 - 6 im DLK-Gen (heterozygot DLK-KO). Eine LoXP-Erkennungssequenz verbleibt. PCR-Nachweis der Anwesenheit der Cre-Recombinase und der Abwesenheit der Flp-Recombinase. Nachweis der loxP-3'-Erkennungssequenz je nach Cre-Deleter und Nachweis auf Heterozygotie und Homozygotie mittels der Exone 2, 5 und 7 (E2, E5 und E7, Pfeile blau).

Für den letzten Verpaarungsschritt (IV) wurden $DLK^{fl/fl}$ Mäuse generiert (flox/flox, homozygot für den *targeting*-Vektor) (Abbildung 2.24) und auf die Anwesenheit der loxP-3'-Erkennungssequenz und Hetero- und Homozygotie überprüft (Abbildung 2.25).

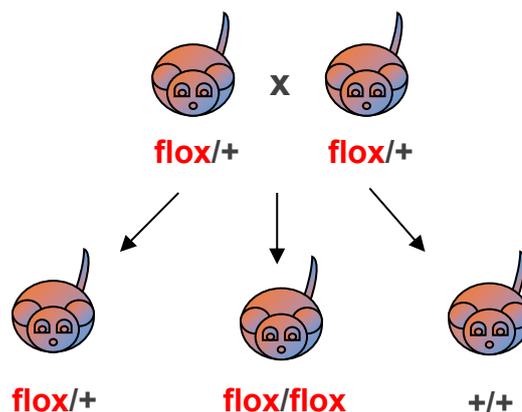


Abbildung 2.24: Schematische Darstellung, Generierung $DLK^{fl/fl}$ (flox/flox) Mäuse (mod. Transgene Tiere, ZMNH): flox/+ Mäuse wurden mit anderen flox/+ Mäusen verpaart. Neugeborene: flox/+ (gefloxt/Wildtyp); flox/flox (gefloxt/gefloxt); +/+ (Wildtyp).

+/+ → Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp)

flox/+ → Wildtyp -Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp)
gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)

flox/flox → gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)

Abbildung 2.25: Nachweis auf Hetero- und Homozygotie mittels PCR: Das PCR-Programm wurde so gewählt, dass nur DNA bis zu 1,5 kb amplifiziert wurde. +/+ Mäuse besitzen beide Wildtyp-Allele; nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande). flox/+ besitzen einen Wildtyp- und einen geflochten Allel; Die Amplifikation von E5-E7 des Wildtyp-Allels und E5-E7 des geflochten-Allels sind nachweisbar (zwei Banden). Homozygote flox/flox Mäuse besitzen beide geflochten-Allele. Nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande).

Im letzten Verpaarungsschritt wurden anschließend die $DLK^{fl/fl}$ Mäuse (flox/flox) mit den heterozygoten DLK-KO Mäusen (flox(Cre)/+) verpaart, um die konditionalen β -zellspezifisch oder globalen DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-} oder DLK^{-/-}) zu generieren (Abbildung 2.26). Die Verpaarung der $DLK^{fl/fl}$ Mäuse mit den globalen heterozygot DLK-KO Mäusen führte zu reduzierten Würfen. Diese globalen homozygoten DLK-KO Mäuse (DLK^{-/-}) starben perinatal im Einklang mit früheren Publikationen (Hirai et al., 2006; Bloom et al., 2007; Ghosh et al., 2011).

Die neugeborenen β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der Cre-Recombinase (Cre RIP) sowie auf Heterozygotie und Homozygotie überprüft (Abbildung 2.28, B und Abbildung 2.29, A).

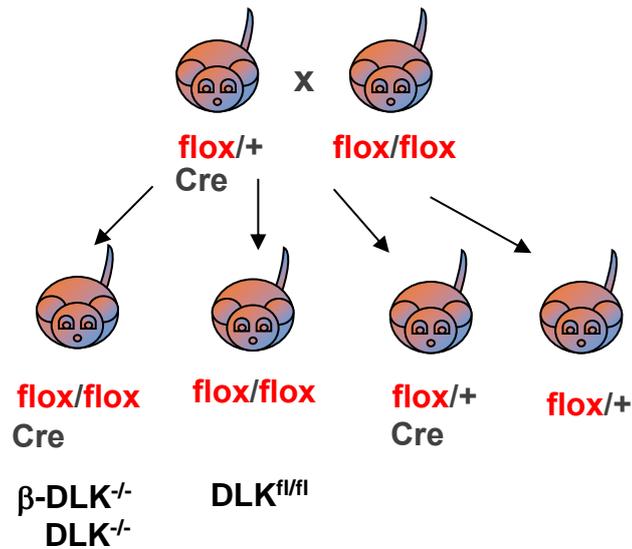


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung, Generierung der konditionalen homozygoten β-zellspezifisch oder globalen DLK defizienten Mäuse (β-DLK^{-/-} oder DLK^{-/-}) sowie der homozygoten DLK^{fl/fl} (flox/flox) Mäuse (mod. Transgene Tiere, ZMNH): heterozygote DLK-KO Mäuse (flox(Cre)/+) wurden mit homozygoten DLK^{fl/fl} (flox/flox) Mäusen verpaart. Neugeborene: flox/flox Cre (homozygot DLK-KO); flox/flox (gefloxt/gefloxt); flox(Cre)/+ (DLK-KO (Cre)/Wildtyp) flox/+ (gefloxt/Wildtyp).

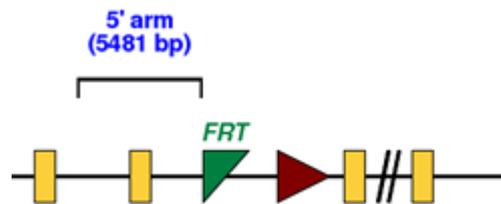


Abbildung 2.27: Schematische Darstellung. Deletion der Exone 3 - 6 des DLK-Gens in beiden Allelen (konditionaler DLK-KO Maus): Die Cre-Recombinase erkennt die loxP-Erkennungssequenzen des DLK-Gens und entfernt die flankierten Exone 3 - 6 im zweiten Allel (homozygot DLK-KO). Eine LoxP-Erkennungssequenz verbleibt.

A

DLK^{-/-} (global)

flox(Cre)/+	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp) gefloxt-Allel: E2-E7 (907 bp); E5-E7 (∅)	Cre positiv
+/+ Cre	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp)	
flox/+	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp) gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)	Cre negativ
flox/flox Cre	→ gefloxt-Allel: E2-E7 (907 bp); E5-E7 (∅)	Perinataler Tod

B

β-DLK^{-/-} (β-zellspezifisch)

flox(Cre)/+	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp) gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)	Cre positiv
+/+ Cre	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp)	
flox/+	→ Wildtyp-Allel: E2-E7 (2494 bp); E5-E7 (1178 bp) gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)	Cre negativ
flox/flox	→ gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)	Cre negativ
flox/flox Cre	→ gefloxt-Allel: E2-E7 (2654 bp); E5-E7 (1258 bp)	Cre positiv

Abbildung 2.28: Nachweis auf Hetero- und Homozygotie bei den DLK defizienten Mäusen mittels PCR: Das PCR-Programm wurde so gewählt, dass nur DNA bis zu 1,5 kb amplifiziert wurde. **A.** flox(Cre)/+ Mäuse besitzen einen Wildtyp- und einen geflochten-Allel; Die Amplifikation von E5-E7 des Wildtyp-Allels und E5-E7 des geflochten-Allels sind nachweisbar (zwei Banden). Zusätzlich sind diese Mäuse Cre positiv. +/+ Cre Mäuse besitzen beide Wildtyp-Allele; nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande). flox/+ Mäuse besitzen einen Wildtyp- und einen geflochten-Allel; Die Amplifikation von E5-E7 des Wildtyp-Allels und E5-E7 des geflochten-Allels sind nachweisbar (zwei Banden). Diese Mäuse sind Cre negativ. Homozygote flox/flox Cre Mäuse besitzen beide geflochten-Allele. Nur die Amplifikation von E2-E7 ist nachweisbar (eine Bande). Diese Mäuse sterben perinatal und der Nachweis kann nur an Leichen erbracht werden. Zusätzlich sind diese Mäuse Cre positiv. **B.** flox(Cre)/+ Mäuse besitzen einen Wildtyp- und einen geflochten-Allel; Die Amplifikation von E5-E7 des Wildtyp-Allels und E5-E7 des geflochten-Allels sind nachweisbar (zwei Banden). Zusätzlich sind diese Mäuse Cre positiv. +/+ Cre Mäuse besitzen beide Wildtyp-Allele; nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande). flox/+ Mäuse besitzen einen Wildtyp- und einen geflochten-Allel; Die Amplifikation von E5-E7 des Wildtyp-Allels und E5-E7 des geflochten-Allels sind nachweisbar (zwei

Banden). Diese Mäuse sind Cre negativ. Homozygote flox/flox Mäuse besitzen beide geflochten-Allele. Nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande). Diese Mäuse sind Cre negativ. Homozygote flox/flox Cre Mäuse besitzen beide geflochten-Allele. Nur die Amplifikation von E5-E7 ist nachweisbar (eine Bande). Zusätzlich sind diese Mäuse Cre positiv.

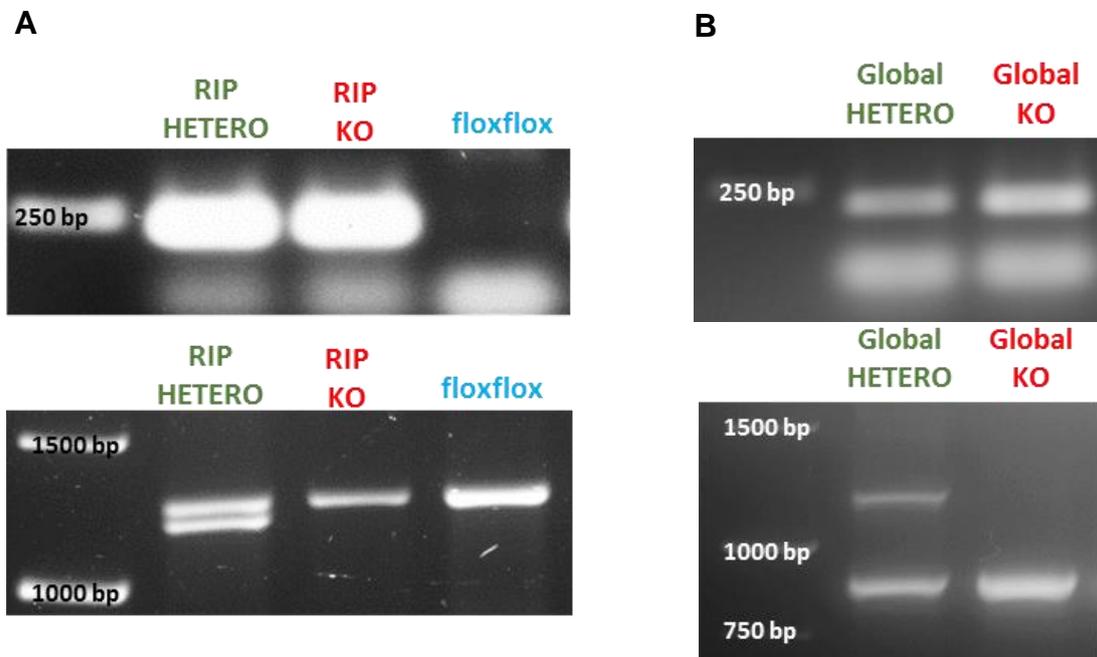


Abbildung 2.29: Bestimmung des Genotyps des letzten Verpaarungsschrittes der generierten DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-} oder DLK^{-/-}): A. Letzter Verpaarungsschritt der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-}). Nachweis der CRE RIP-Recombinase (obere Abbildung) und der Hetero- oder Homozygotie (untere Abbildung) B. Letzter Verpaarungsschritt der globalen DLK defizienten Mäusen (DLK^{-/-}). Nachweis der CRE GLOB-Recombinase (obere Abbildung) und der Hetero- oder Homozygotie (untere Abbildung). Global DLK-KO Mäuse sterben perinatal (zusätzlich als Nachweis der Aktivität der CRE GLOB-Recombinase).

2.2.4.2 Glukoseinduzierte Insulinsekretion

Die glukoseinduzierte Insulinsekretion wurde mittels Perfusion frisch isolierter Inseln analysiert (siehe Isolierung Langerhans'scher Inseln). Die Perfusion ist eine Methode, die zur Beobachtung der Stimulussekretion in zellphysiologischen Prozesse verwendet werden kann (Willenborg et al., 2012). Die Insel-Isolation und die anschließende Perfusion von insgesamt 5 Mäuse pro Genotyp (15 - 18 Wochen alt) wurden in der Gruppe von Prof. Ingo Rustenbeck (TU, Braunschweig) durchgeführt. Die Insulinsekretion aus je 50 Inseln pro Maus wurde mittels Glukose (5 mM und 30 mM) stimuliert. Die Perfusion erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,9 mL/min und bei

einer Temperatur von 37 °C. Anschließend wurde der Insulingehalt unter Verwendung eines ELISA (MercoDia, Uppsala, Schweiz) bestimmt.

2.2.4.3 Isolierung Langerhans'scher Inseln

Für die Isolierung muriner Langerhans'scher Inseln des Pankreas wurde der Collagenase-Verdau (Collagenase NB 8) durch Ductusinjektion angewendet (Willenborg et al., 2012). Diese Methode erlaubt eine 2 - 4-fache höhere Ausbeute pankreatischer Inseln gegenüber der konventionellen Methode (Gotoh et al., 1985). Die Ductusinjektion und der Collagenaseverdau wurden in einem Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Ingo Rustenbeck (TU, Braunschweig) erlernt.

Die Isolation Langerhans'scher Inseln wurde bei β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen im Alter von 14 - 18 Wochen durchgeführt. Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation geopfert, der Bauchraum geöffnet und Leber und Darm freigelegt.

Die Ampulla (Papilla duodeni major), eine Erhebung der Schleimhaut, wurde auf der Duodenum-Wand lokalisiert und abgeklemmt (Abbildung 2.30). Der Gallenweg zum Duodenum wurde dadurch blockiert. Hiernach wurden 2 mL der auf Eis gekühlten Collagenase-Lösung (1,36 Units/mg) in den gemeinsamen Gallengang mittels einer 30 G-Kanüle injiziert.

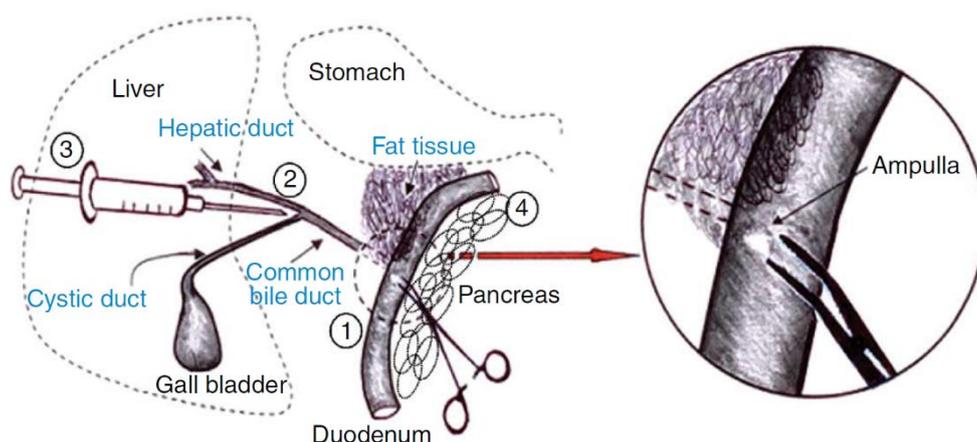


Abbildung 2.30: Verfahren der Ductus-Injektion und Pankreas-Entfernung (Mod. Dong-Sheng et al., 2009). Die eingekreisten Zahlen entsprechen den zu folgenden Schritten zur Pankreas-Perfusion; (1) Klemmen der Ampulla, (2) Positionieren der Nadel in den gemeinsamen Gallengang, (3) Injektion der Collagenaselösung und (4) Entfernung des geschwollenen Pankreas vom umliegenden Gewebe.

Das Pankreas schwoll an und konnte leichter vom umliegenden Gewebe befreit werden (Abbildung 2.31).

Vor Ductus-Injektion Nach Ductus-Injektion



Abbildung 2.31: Pankreas vor und nach Ductus-Injektion. Exemplarische Aufnahmen einer 15 Wochen alten Maus vor (links) und nach (rechts) Perfusion. Der Pfeil zeigt die Lokalisation des Pankreas.

Das Pankreas wurde in ein 15 mL Plastikröhrchen mit 5 mL KR-Puffer überführt, bei 37 °C im Wasserbad für 8 - 9 min inkubiert (abhängig von der Collagenase-Charge) und anschließend 1 min kräftig mit der Hand geschüttelt, um das exokrine Pankreas zu verdauen. Die Collagenaseaktivität wurde durch Zugabe von 10 mL kaltem KR-Puffer und durch Lagerung des Plastikröhrchens auf Eis gestoppt. Diese homogene Gewebesuspension wurde bei 300 xg und bei 4 °C zweimal mit je 5 mL KR-Puffer für 30 s gewaschen und in 10 mL KR-Puffer wieder aufgenommen. Hierbei wurde der Überstand bei den Waschschrinen vorsichtig abgekippt und verworfen.

Die Inseln wurden auf einer schwarzen 10 cm Schale mittels einer Pipette mit weit geöffneter Spitze gesammelt und auf eine weitere schwarze 10 cm Schale manuell transferiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und im Anschluss die Inseln gezählt.

Die Inseln wurden in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 300 xg und 4 °C für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Für einen Immunoblot wurden die Inseln bei -80 °C gelagert. Zur Kultivierung der Inseln wurde diese zweimal in 1 mL RPMI-Medium-Inseln gewaschen. Nach jeder Zugabe vom Medium wurden

die Inseln bei 300 xg und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Langerhans'schen Inseln in 600 µL RPMI-Medium-Inseln aufgenommen und in eine 12-*well*-Zellkulturplatte überführt (Kapitel 2.2.4.4).

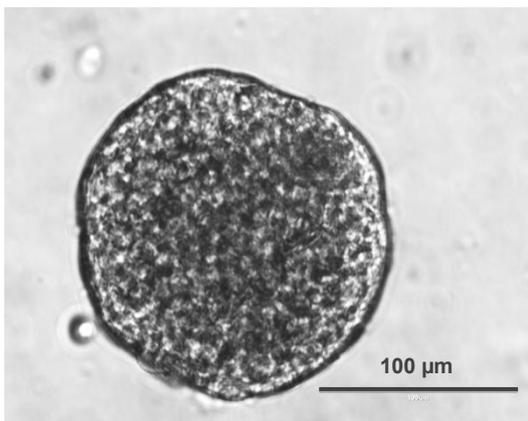
Die Injektion der Collagenase-Lösung sowie das Picken der Inseln wurden unter einem Stereomikroskop mit Lichtquelle (Zeiss Stemi 2000, VisiLED MC 1000) vorgenommen.

2.2.4.4 Kultivierung isolierter Langerhans'schen Inseln

Frisch isolierte Inseln wurden in einer 12-*well*-Zellkulturplatte (etwa 60 Inseln pro *well*) mit 600 µL RPMI-Medium 1640 inklusive 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (RPMI-Medium-Inseln) für bis zu 5 Tage inkubiert. Am 3. Tag wurden 400 µL frischen Mediums hinzugegeben. Die Inseln wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

Die meisten der adhärenierten Inseln verlieren ab dem 6. - 7. Tag ihre Inselmorphologie. Sie verschmelzen mit dem Boden der Kulturplatte, die Bindegewebshülle verliert ihre Form (auch sog. Kapselform), sodass die Zellansammlungen letztlich nicht mehr zurückgehalten werden können (Abbildung 2.32).

1. Tag nach Isolation



7. Tag nach Isolation

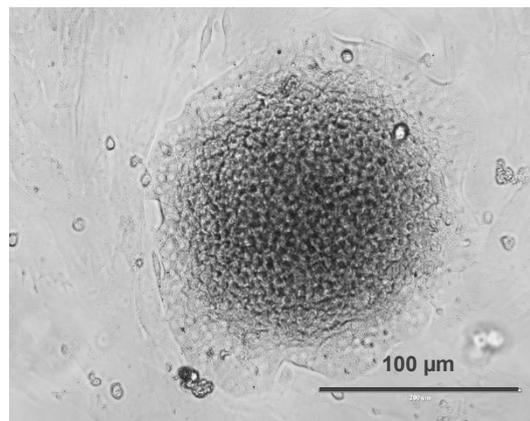


Abbildung 2.32: Verlust der Inselmorphologie ab Tag 7 nach Isolation. Repräsentative Aufnahmen einer Insel von einer 15 Wochen alten Maus am 1. Tag (links) oder am 7. Tag (rechts) nach der Isolation.

2.2.4.5 Immunhistologische Analyse

Verwendete Antikörper

Tabelle 2.9: Verwendete Primär- Sekundärantikörper zur immunhistologischen Färbungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Anwendung
β-Galactosidase (Rabbit)	Invitrogen	1:100	DAB
DLK (Rabbit)	Holzmann et al., 1994 Fan et al., 1996	1:50	DAB/IF
Insulin (Maus)	Sigma	1:50	DAB/IF
Glucagon (Rabbit)	Cell Signaling Technology	1:200	IF
Anti-Maus	Dianova	1:50	DAB
Anti-Rabbit	Dianova	1:50	DAB
AlexaFluor488 Anti-Rabbit	Invitrogen	1:50	IF
TRITC Anti-Maus	Invitrogen	1:50	IF

DAB-Stammlösung 1%:

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 100 mg

dH₂O 10 mL

➔ 1 mL Aliquots werden in braunen 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

DAB-Färbelösung (frisch vor Gebrauch herzustellen)

DAB-Stammlösung 1% 1 mL

H₂O₂ 30% 10 µL

dH₂O ad 10 mL

Blockpuffer DAB

BSA	1 g
1x PBS	100 mL

0,3% Wasserstoffperoxid-Lösung (frisch vor Gebrauch herzustellen)

H ₂ O ₂ 30%	10 µL
1x PBS	ad 1 mL

Antikörperlösung DAB

BSA	0,1 g
1x PBS	100 mL

Blockpuffer IF

BSA	2,5 g
Triton X-100	150 µL
1x PBS	ad 50 mL

Antikörperlösung IF

BSA	1 g
1x PBS	100 mL

2.2.4.5.a Immunhistologische Untersuchung mittels einer 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung an Paraffinschnitten

Die frisch isolierten Pankreata von 20 - 25 Wochen alten Mäuse wurden in einer 4% PFA (Paraformaldehyd)/ PBS-Lösung bei 4 °C über Nacht fixiert. Die Paraffineinbettung und die Herstellung von 3 µm dicken Gewebeschnitten erfolgten durch die Mauspathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach Standardtechniken.

Die Paraffingewebeschnitte wurden vor der Färbung entparaffiniert und rehydriert. Hierfür wurden die Objektträger schrittweise in verschiedenen Badmedien bei RT getaucht (Tabelle 2.10):

Tabelle 2.10: Rehydrieren von Gewebeparaffinschnitten

Medium	Dauer
Xylol	3x 10 min
98% Ethanol	5 min
96% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
80% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
dH ₂ O	5 min

Nach der Entparaffinierung der Schnitte erfolgten die Blockierung der endogenen Peroxidase mit einer 0,3% Wasserstoffperoxid/PBS im Dunkeln für 30 min und zweimaliges Waschen mit PBS. Im nächsten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockpuffer DAB bei RT für 30 min blockiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die in der Tabelle 2.9 aufgeführten Primärantikörper in der Antikörperlösung DAB entsprechend verdünnt (60 µL/Schnitt) und bei 4 °C über Nacht auf Parafilm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeparaffinschnitte dreimal mit Antikörperlösung DAB gewaschen und mit dem entsprechend der Spezies in Antikörperlösung DAB verdünnten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal mit dH₂O gewaschen und die Schnitte mit 60 µL der 0,1% Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung für 2 - 5 min behandelt. Die DAB-Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und spätestens nach 5 min durch dreimaliges Waschen mit dH₂O gestoppt. Das an dem Sekundärantikörper gekoppelten HRP (*horseradish peroxidase*) bildet mit dem in der DAB-Färbelösung enthaltenen Wasserstoffperoxid als Substrat einen Komplex, wobei DAB als elektrogenspendendes Chromogen fungiert und zum braunen Endprodukt oxidiert wird.

Anschließend erfolgte die Hämalaun-Gegenfärbung (Hämalaun sauer nach Mayer; ROTH®) für 2 - 5 min, das dreimalige Waschen mit dH₂O für 5 min, die Dehydrierung (Tabelle 2.11) und das Eindeckeln der Gewebeparaffinschnitte mit einem Deckgläschen und Roti®-Histokit II.

Tabelle 2.11: Dehydrieren von Gewebeparaffinschnitten

Medium	Dauer
70% Ethanol	2 min
80% Ethanol	2 min
90% Ethanol	2 min
96% Ethanol	2 min
98% Ethanol	5 min
Xylol	3 min

Die mikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Gewebeparaffinschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 bei 20- und 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.2.4.5.b Immunhistologische Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Färbung an Pankreas-Kryoschnitten

Die frisch isolierten Pankreata von 20 - 25 Wochen alten Mäuse wurden zügig nach der Entnahme auf gefrorenen 2-Methylbutan (Porzellanschale im flüssigen Stickstoff) gelegt und langsam gefroren. Anschließend wurden die Organe in ein in Stickstoff stehendes 15 mL Plastikröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Vor Herstellung der Gefrierschnitte wurde das Pankreasgewebe mit O.C.T™ (Tissue Tek®) im Kryostat (LEICA CM3050 S) eingedeckt und die festen Blöcke bei -20 °C für 2 h gelagert. Die Pankreata wurden am Kryostat zu 10 µm dicken Gefrierschnitten verarbeitet, auf Objektträger aufgebracht (SuperFrost/Plus) und bei -20 °C gelagert.

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden bei 37 °C im Brutschrank für 15 - 20 min getrocknet und anschließend mit Aceton für 7 min fixiert. Hiernach wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit Blockpuffer für 2 h inkubiert. Nach zwei Waschschr

mit PBS wurden die Kryoschnitte mit den in der Tabelle 2.9 aufgeführten Primärantikörper in der Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gefrierschnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechend der Spezies in der Antikörperlösung verdünnten Fluoreszenz gekoppelten Sekundärantikörper für 2 h lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte mit DAPI-Mounting-Medium (4',6-diamino-2-phenylindol) eingedeckelt. Die Objektträger wurden lichtgeschützt für min. 48 h gelagert und getrocknet. Die Detektion der Immunfluoreszenz gelang mithilfe eines konfokalen Mikroskops (*Zeiss Axio Observer.Z1*) bei einer 20- und 40-facher Vergrößerung des Objektivs.

2.2.4.5.c Immunhistologische Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Färbung an isolierten Langerhans'schen Inseln

Die frisch isolierten Inseln wurden in einer 12-*well*-Zellkulturplatte (etwa 60 Inseln pro *well*) mit 600 µL RPMI 1640 inklusive 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (RPMI-Medium-Inseln) für 3 - 4 Tage auf Deckgläschen (Ø 13 mm) bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Inseln entsprechend Kapitel 2.2.3.2 auf Deckgläschen behandelt und gefärbt.

2.2.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM (SE/\sqrt{n}) ausgedrückt und mithilfe der Software *GraphPad Prism 5* analysiert. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test angewendet. Für den Mehrfach-Vergleich wurde eine Einweg-Analyse der Varianz (ANOVA-Test) gefolgt von einem Bonferroni Post-Hoc-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau (p-Wert) wurde $p < 0,05$ (*) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Subzelluläre Lokalisation der DLK

3.1.1 Charakterisierung eines funktionellen *Nuclear Export Signal* (NES) innerhalb der DLK

Eine *in silico* Analyse mittels des NetNES 1.1 Servers (*Center for Biological Sequence Analysis*, Technische Universität in Dänemark) offenbarte 481-LQLEL-485 als Konsensus Motiv für das Nukleäre Exportsignal (NES) innerhalb der DLK (La Cour et al., 2004).

Mittels *site-directed mutagenesis* wurden die Leucine 481, 483 und 485 in Alanine mutiert (DLK NES), um das Signal für den nukleären Export der DLK zu zerstören.

Vorigen Studien zufolge spielt CREB (*cAMP response element binding protein*) eine essentielle Rolle zur Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und β -Zellmasse (Oetjen et al., 2003a, 2003b, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung der DLK zu einer Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription und seiner Koaktivatoren CBP (*CREB binding protein*) und CRTC1 (*cAMP regulated transcriptional coactivator 1*) führt sowie zur Verminderung der Insulingentranskription und Induktion der β -Zellapoptose (Oetjen et al., 2006; Phu et al., 2011; Plaumann et al., 2008; Stahnke et al., 2014).

Die Auswirkung der DLK NES Mutante sollte daher in Bezug auf Proteinexpression, Phosphorylierung untergeordneter Kinasen, KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription, stimulusinduzierte nukleäre Translokation und β -Zellapoptose untersucht werden.

3.1.1.1 DLK NES Proteinexpression und enzymatische Aktivität

Die Überexpression von DLK NES in HIT-T15 Zellen wurde mittels transients Transfektion und Immunoblotanalyse bezüglich der Phosphorylierung von JNK/SAPK (c-Jun N-terminale Kinase oder Stress-Aktivierte Protein Kinase) mit DLK wt verglichen. DLK führt über die Aktivierung von MKK7 bzw. MKK4 (Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 7 bzw. 4) zu einer Phosphorylierung dieser untergeordneten

Kinase, welche als Maß für die enzymatische Aktivität der DLK gilt. Für diesen Aktivierungsschritt benötigt die DLK eine funktionierende Kinase-Domäne.

DLK NES und DLK wt wurden in demselben Ausmaß exprimiert und unterschieden sich nicht in ihrer enzymatischen Aktivität (JNK-Phosphorylierung) (Abbildung 3.1). Die DLK NES Mutante besitzt folglich eine katalytisch aktive Kinase-Domäne.

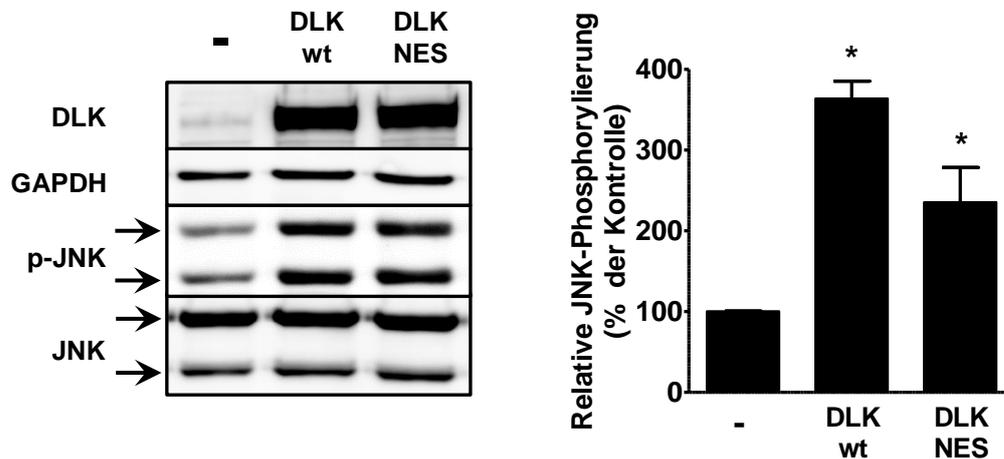


Abbildung 3.1: Expression von DLK NES und Vergleich der jeweiligen Phosphorylierung von JNK. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK NES transfiziert. Links, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen das COOH-Ende der DLK, gegen an Thr-183 und Tyr-185 phosphorylierte JNK, gegen JNK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Die schwarzen Pfeile bei JNK und pJNK zeigen die ausgewerteten Banden (46 kDa und 54 kDa). Rechts, quantitative Auswertung. Die phosphorylierten JNK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der JNK-repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Diese Werte sind relativ zu den Werten ohne DLK Überexpression und sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmung. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle „-“; t-Test.

3.1.1.2 DLK NES und stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription

Das *cAMP response element* (CRE) stellt die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB dar. Die enzymatische Aktivierung der DLK führt zu einer Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription (Reddy et al., 1994; Oetjen et al., 2006; Phu et al., 2011).

Der Effekt der DLK NES auf die durch Membrandepolarisation stimulierte CRE-abhängige Gentranskription wurde mittels eines Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle von vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatin Promotors in HIT-T15 Zellen untersucht und mit dem Effekt des DLK wt verglichen (Abbildung 3.2).

ERGEBNISSE

Die Membrandepolarisation wurde durch Stimulierung der Zellen mit KCl (40 mM) induziert, was einen konsekutiven Calciumeinstrom durch spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle bewirkt. Zusätzlich wurde der Effekt des prädiabetischen Cytokins $TNF\alpha$ auf die CRE-abhängigen Gentranskription mit und ohne Membrandepolarisation untersucht.

Die Überexpression der DLK NES Mutante führte zu einer Hemmung der durch Membrandepolarisation induzierten CRE-abhängigen Gentranskription. Dieser hemmende Effekt konnte durch die Behandlung mit $TNF\alpha$ (10 ng/mL für 20 h) gesteigert werden.

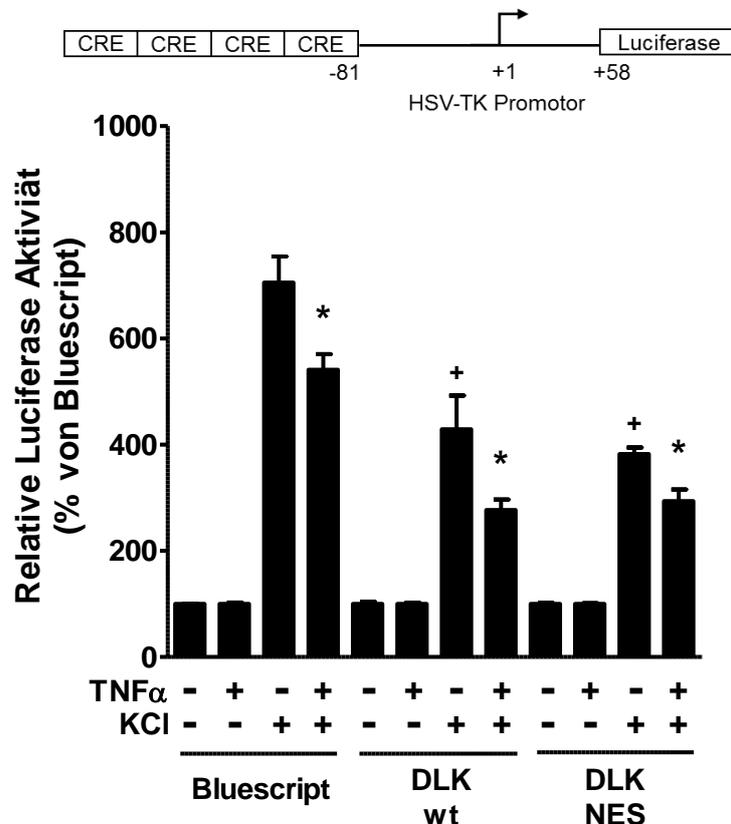


Abbildung 3.2: Kein Unterschied zwischen DLK wt und DLK NES in Bezug auf die mit $TNF\alpha$ - und KCl-stimulierte CRE-abhängige Gentranskription. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert. Bluescript (Leervektor) und die Expressionsvektoren für DLK wt und DLK NES wurden kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 20 h mit $TNF\alpha$ (10 ng/mL) behandelt und 6 h vor der Ernte mit KCl (40 mM) zur Membrandepolarisation stimuliert. Oben, schematische Darstellung des Luciferase-Reportergens. Unten, quantitative Auswertung. Die Luciferase Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne KCl-Behandlung in jeder Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM der drei unabhängigen Experimente, jeweils in Doppelbestimmung. *p = 0,05 vs. KCl Behandlung ohne $TNF\alpha$; +p = 0,05 vs. KCl Behandlung ohne DLK wt oder DLK NES Überexpression; einfache ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Post-Hoc-Test.

3.1.1.3 DLK NES, nukleäre Lokalisation und β -Zellapoptose

Die subzelluläre Lokalisation von DLK wt und den DLK Mutanten DLK NES und DLK K185A wurde mittels transienter Transfektion in HIT-T15 Zellen und anschließender immunocytochemischer Analyse untersucht. Die DLK K185A Mutante, mit veränderter ATP-Bindungsdomäne, stellte die negative, katalytisch inaktive Kontrolle dar (Mata et al., 1996).

Die überexprimierten DLK wt, DLK NES und DLK K185A in den Zellen konnten mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop der Expressionsvektoren identifiziert werden. Zur Bestimmung der β -Zellapoptose wurde als Apoptosemarker die fragmentierte Caspase-3 (*cleaved caspase-3*) verwendet. DAPI diente der DNA-Kernfärbung.

48 h nach der transienten Transfektion wurden die Zellen für 60 min mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt, um die nukleäre Translokation der DLK zu induzieren (Abbildung 3.3). Nach 60 min wurde das Medium gegen cytokinfreies Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 1, 3 und 6 h inkubiert, um den anhaltenden Effekt der nukleären Lokalisation zu untersuchen.

DLK wt und die DLK Mutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der basalen unstimulierten nukleären Lokalisation (wt: $7,6 \pm 1,79\%$; NES: $7,4 \pm 1,04\%$; K185A: $7,4 \pm 0,54\%$). Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ induzierte die nukleäre Lokalisation von DLK wt und DLK NES um das 2,5-fache (wt: $18,9 \pm 2,32\%$; NES: $18,4 \pm 1,77\%$). Das Entfernen von $\text{TNF}\alpha$ bewirkte, dass DLK wt bereits nach 1 h nicht mehr im Nukleus nachweisbar war (1 h: $5,4 \pm 0,69\%$), die DLK NES Mutante hingegen konnte bis 6 h im Nukleus identifiziert werden (6 h: $21,1 \pm 1,46\%$). Die DLK K185A verblieb nach Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ cytoplasmatisch (Abbildung 3.4).

Um die β -Zellapoptose zu untersuchen wurde der Anteil der fragmentierten Caspase-3 positiven Zellen an der Gesamtheit der DLK positiven Zellen ermittelt (Abbildung 3.5).

HIT Zellen mit überexprimierten DLK wt und DLK NES zeigten eine ähnliche spontane Apoptoserate (wt: $18,6 \pm 2,32\%$; NES: $21,1 \pm 2,98\%$).

Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ führte in den mit DLK wt und DLK NES transient transfizierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der β -Zellapoptose (wt: $43,0 \pm 2,46\%$; NES: $57,2 \pm 1,43\%$). 6 h nach Entfernen von $\text{TNF}\alpha$ war die

ERGEBNISSE

apoptoseinduzierende Wirkung der DLK NES Mutante stärker ausgeprägt als die von DLK wt (wt: $37,9 \pm 4,01\%$; NES: $61,4 \pm 4,52\%$). Die Überexpression der Kinase inaktiven Mutante DLK K185A zeigte mit und ohne $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung eine signifikant geringere Apoptoserate in den Zellen im Vergleich zu DLK wt und DLK NES („-“: $5,4 \pm 1,68\%$; „+“: $15,8 \pm 5,06\%$).

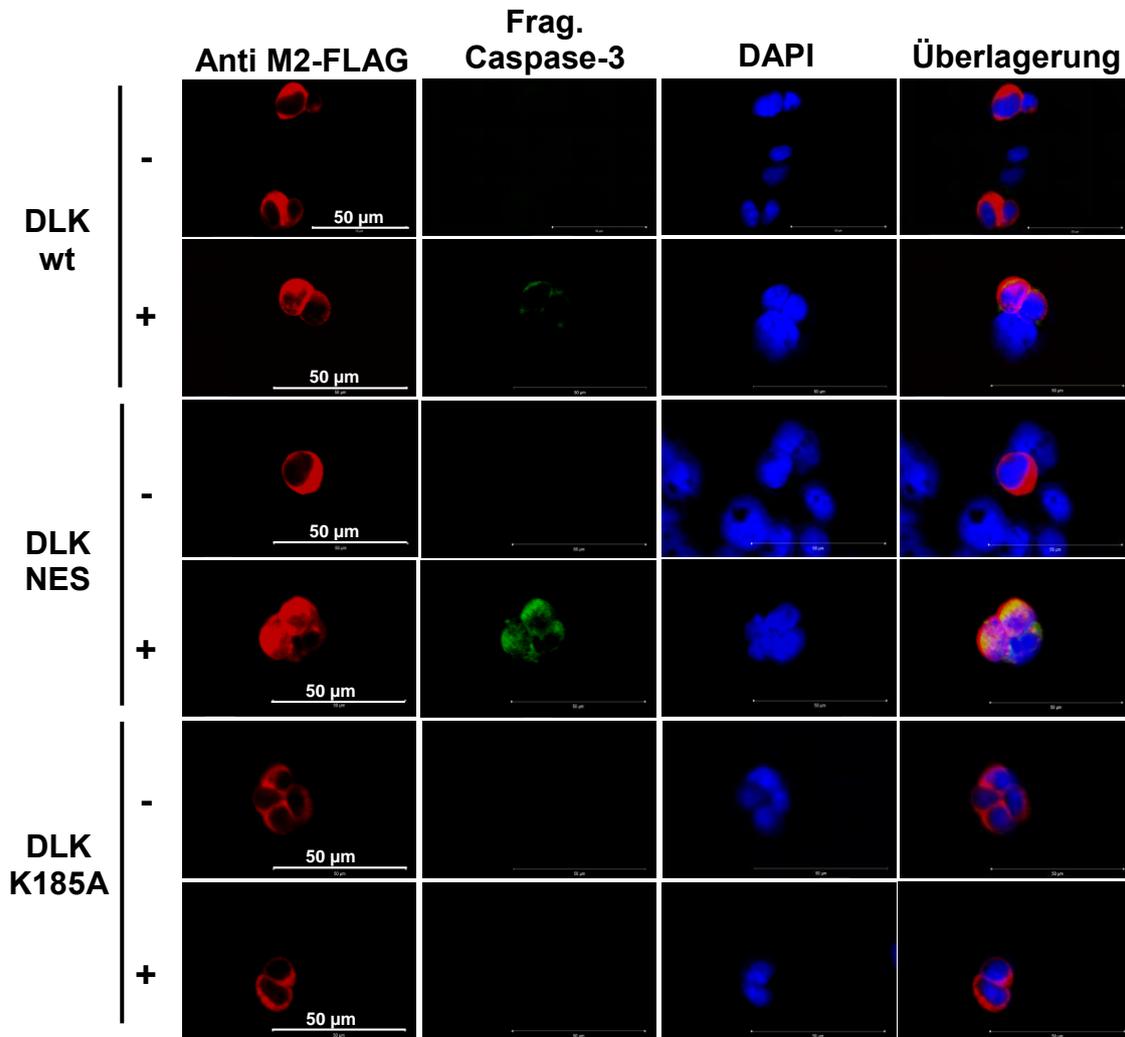


Abbildung 3.3: Exemplarische immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der transient transfizierten HIT Zellen. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK NES und DLK K185A transfiziert und nach 48 h für 60 min mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt (+). Linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (DLK); mittlere linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen die fragmentierte Caspase-3 (Apoptose); mittlere rechte Spalte, DNA-Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild.

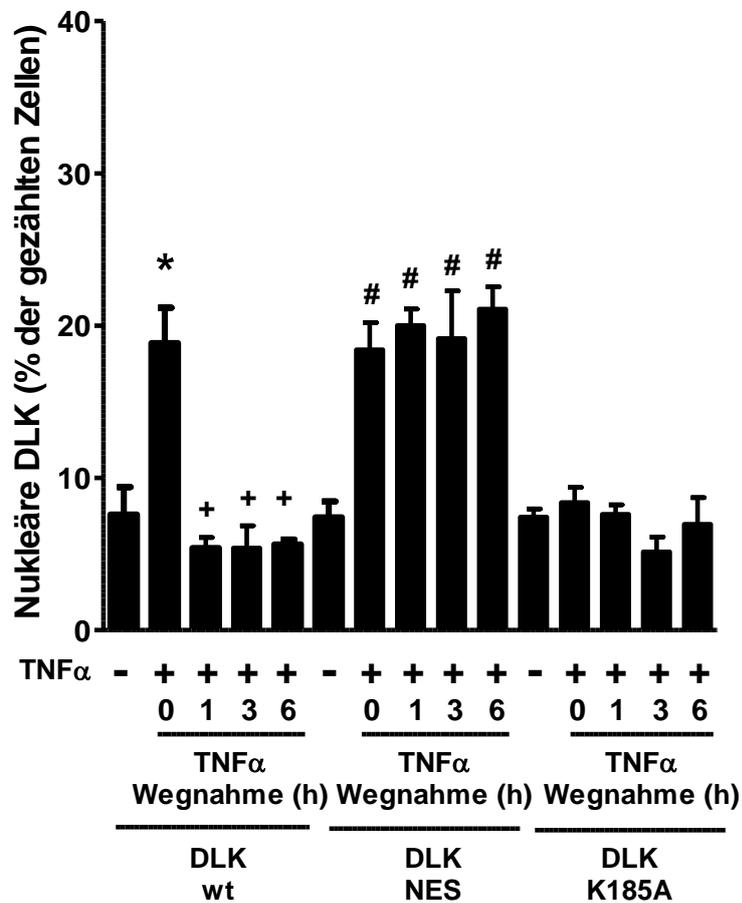


Abbildung 3.4: Auswirkung der DLK NES Mutante auf die nukleäre Lokalisation. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK NES und DLK K185A transfiziert und mit TNF α (10 ng/mL) für 60 min behandelt (+). TNF α wurde nach 60 min Behandlung (Zeit 0) durch Mediumwechsel entfernt. Die Zellen wurden in Abwesenheit des Cytokins für zusätzliche 1, 3 und 6 h kultiviert wie angegeben. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Zellen mit nukleärer DLK als prozentualer Anteil aller DLK positiven Zellen. Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung. * $p < 0,05$ vs. keine TNF α -Behandlung "-“ in mit DLK wt transfizierten Zellen; + $p < 0,05$ vs. Behandlung mit TNF α ("+", 0 h) in mit DLK wt transfizierten Zellen. # $p < 0,05$ vs. mit DLK NES transfiziert und ohne Behandlung mit TNF α „-“; einfache ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Post-Hoc-Test.

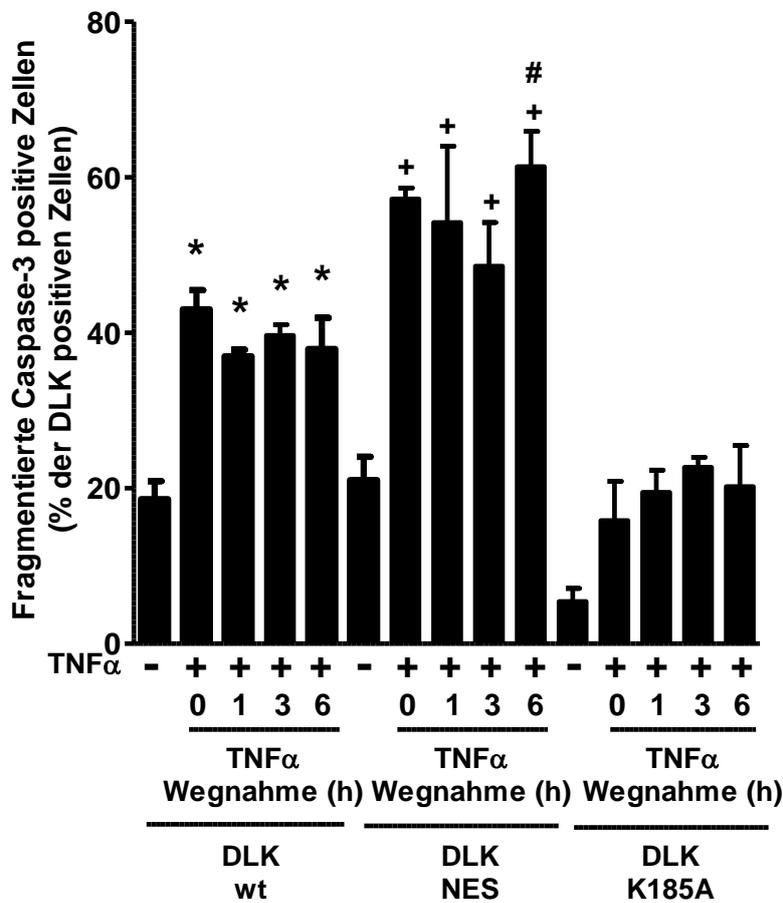


Abbildung 3.5: Auswirkung der DLK NES Mutante auf die β -Zellapoptose. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK NES und DLK K185A transfiziert und mit $TNF\alpha$ (10 ng/mL) für 60 min behandelt (+). $TNF\alpha$ wurde nach 60 min Behandlung (Zeit 0) durch Mediumwechsel entfernt. Die Zellen wurden in Abwesenheit des Cytokins für zusätzliche 1, 3 und 6 h kultiviert wie angegeben. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die mit einem Antikörper gegen die fragmentierte Caspase-3 von allen DLK positiven Zellen gefärbt wurden. Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung. * $p < 0,05$ vs. keine $TNF\alpha$ -Behandlung in mit DLK wt transfizierten Zellen („-“, wt); + $p < 0,05$ vs. keine $TNF\alpha$ -Behandlung in mit DLK NES transfizierten Zellen („-“, NES). # $p < 0,05$ vs. $TNF\alpha$ -Behandlung nach 6 h Abwesenheit des Cytokins in DLK wt transfizierten Zellen („+“, 6 h, wt); einfache ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Post-Hoc-Test.

3.1.2 Kontrollen der stimulusinduzierten nukleären Translokation der DLK

3.1.2.1 Kontrolle der stimulusinduzierten subzellulären Lokalisation der DLK mit einem cytoplasmatischen Protein

Ein cytoplasmatisches Fusionsprotein, der cAMP-Sensor, bei dem die cAMP Bindungsstelle der *exchange protein activated by cAMP 2* (EPAC 2) von einem gelb (YFP) und einem cyan (CFP) fluoreszierenden Protein flankiert ist (Nikolaev et al., 2004), wurde als Negativkontrolle für die nukleäre Translokation verwendet. Der Expressionsvektor dieses Proteins wird in der Regel zur Messung der intrazellulären cAMP Konzentration mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) eingesetzt und wurde uns für diese Experimente von Prof. Nikolaev (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

HIT-T15 Zellen wurden mit dem cAMP-Sensor transient transfiziert und für 60 min entweder mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt. Die Überexpression dieses Proteins wurde in lebenden Zellen bei Messung der gelben Fluoreszenz (YFP, *engl. yellow fluorescent Protein*) analysiert. Die DNA in den Kernen wurde mit Draq5 gefärbt. Der cAMP-Sensor wurde überwiegend im Cytoplasma detektiert (Abbildung 3.6). Nur $3,6 \pm 1,73\%$ aller gezählten Zellen wurden im Kern beobachtet. Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ führte zu keiner Erhöhung der subzellulären Lokalisation dieses cytoplasmatischen Proteins ($3,1 \pm 2,24\%$ aller transient transfizierter Zellen).

Zusätzlich wurde die Kolokalisation des cAMP-Sensors mit dem überexprimierten DLK wt in HIT-T15 Zellen untersucht. Hierfür wurden HIT-T15 Zellen mit den Expressionsvektoren für den M2-FLAG Epitop markierten DLK wt sowie für den cAMP-Sensor transient transfiziert. Die Zellen wurden für 60 min entweder mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop wurde die Überexpression der DLK beobachtet. Für das cytoplasmatische Protein wurde aufgrund der Ähnlichkeit der fluoreszierenden Proteine (CFP, GFP, YFP) ein Antikörper gegen GFP (grün fluoreszierendes Protein) verwendet, um das YFP/CFP des cAMP-Sensors zu detektieren. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

ERGEBNISSE

Die Kolokalisation beider Proteine wurde ohne Behandlung mit dem proinflammatorischen Cytokin im Cytoplasma beobachtet. $\text{TNF}\alpha$ führte zur nukleären Translokation des DLK wt während der cAMP-Sensor im Cytoplasma verblieb (Abbildung 3.7).

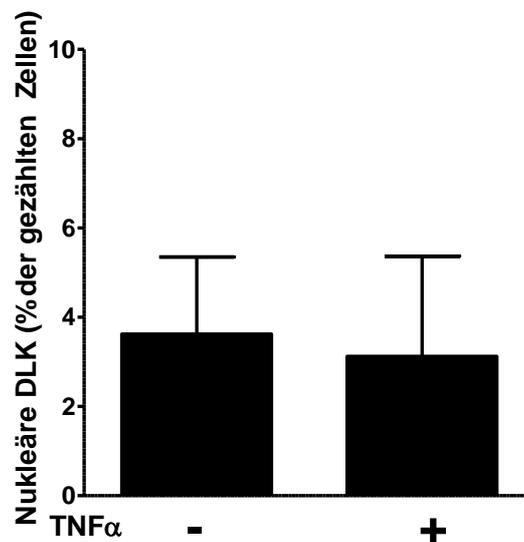
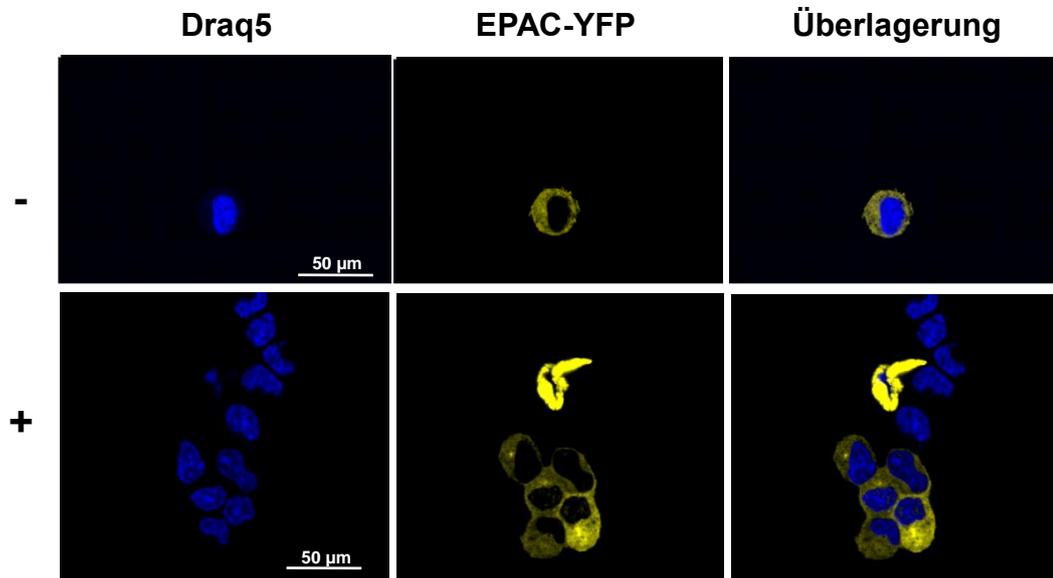


Abbildung 3.6: Cytoplasmatische Lokalisation des cAMP-Sensors mit und ohne $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung (Lebendfärbung). HIT-T15 Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für die cAMP Bindungsstelle der *exchange protein activated by cAMP 2* (EPAC 2) transfiziert und für 60 min mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt (+). Oben, repräsentative Aufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung. Linke Spalte, DNA-Kernfärbung (Draq5); mittlere Spalte, Detektion des mit YFP-markierten cAMP-Sensors; rechte Spalte, Überlagerungsbild. Unten, quantitative Auswertung als prozentualer Anteil der Zellen mit nukleärem cAMP-Sensor in allen cAMP-Sensor positiven Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Zweifachbestimmung.

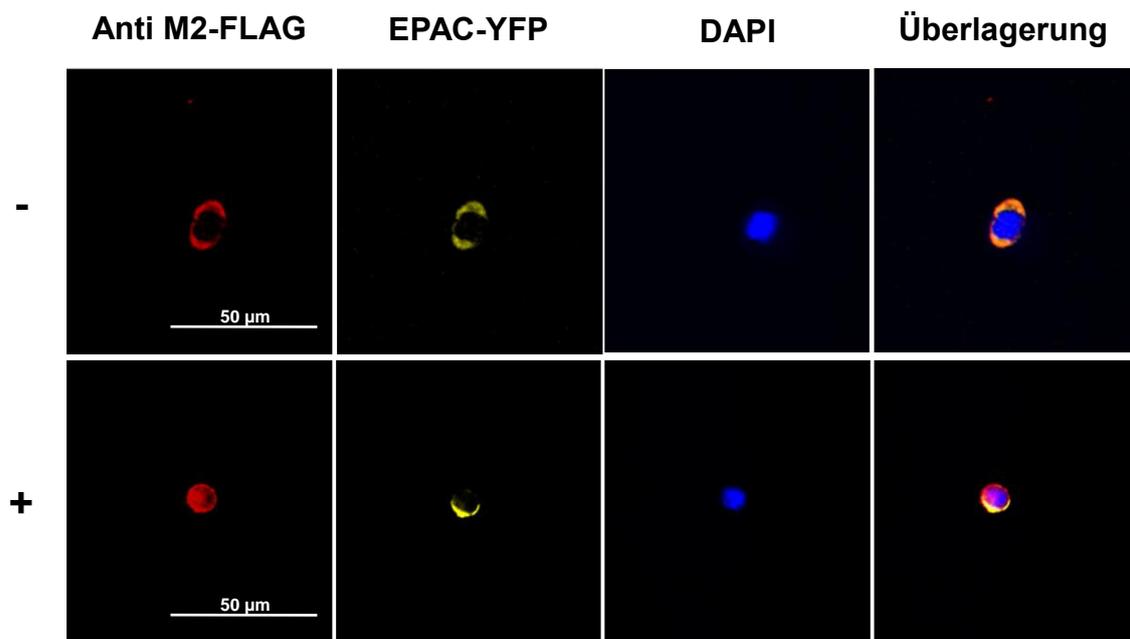


Abbildung 3.7: Kolokalisation des cAMP-Sensors mit überexprimiertem DLK wt. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für den cAMP-Sensor und für DLK wt kotransfiziert und für 60 min mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt (+). Repräsentative Aufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung. Linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (DLK); mittlere linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen GFP für den YFP-markierten cAMP-Sensor; mittlere rechte Spalte, DNA-Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild.

3.1.2.2 Kontrolle der stimulusinduzierten nukleären Translokation der überexprimierten DLK in Abwesenheit endogener DLK

Um auszuschließen, dass die subzelluläre DLK-Lokalisation von der endogenen Aktivität dieser Kinase in HIT-T15 Zellen ausgelöst wird, wurden JEG-3 Zellen, eine DLK negative Zelllinie (Abbildung 3.8), mit den Expressionsvektoren für DLK wt und der katalytisch inaktiven DLK K185A Mutante transient transfiziert und nach 48 h für 60 min ohne oder mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) behandelt. Die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ führte zu einer verstärkten nukleären Lokalisation des DLK wt ($27,6 \pm 7,00\%$) aller transient transfizierten JEG-3 Zellen. Die Lokalisation der katalytisch inaktiven DLK-Mutante K185A wurde durch die $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung nicht verändert ($3,1 \pm 2,09\%$) (Abbildung 3.9).

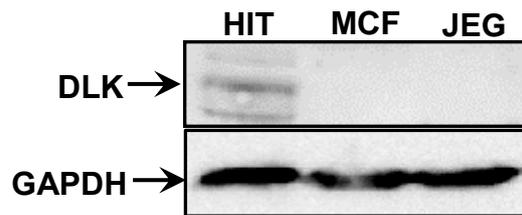


Abbildung 3.8: Identifizierung einer Zelllinie ohne endogene Expression von DLK. Typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen das COOH-Ende der DLK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. HIT Zellen (positive Kontrolle), MCF Zellen (human breast carcinoma Zelllinie) und JEG-3 Zellen (human choriocarcinoma Zelllinie).

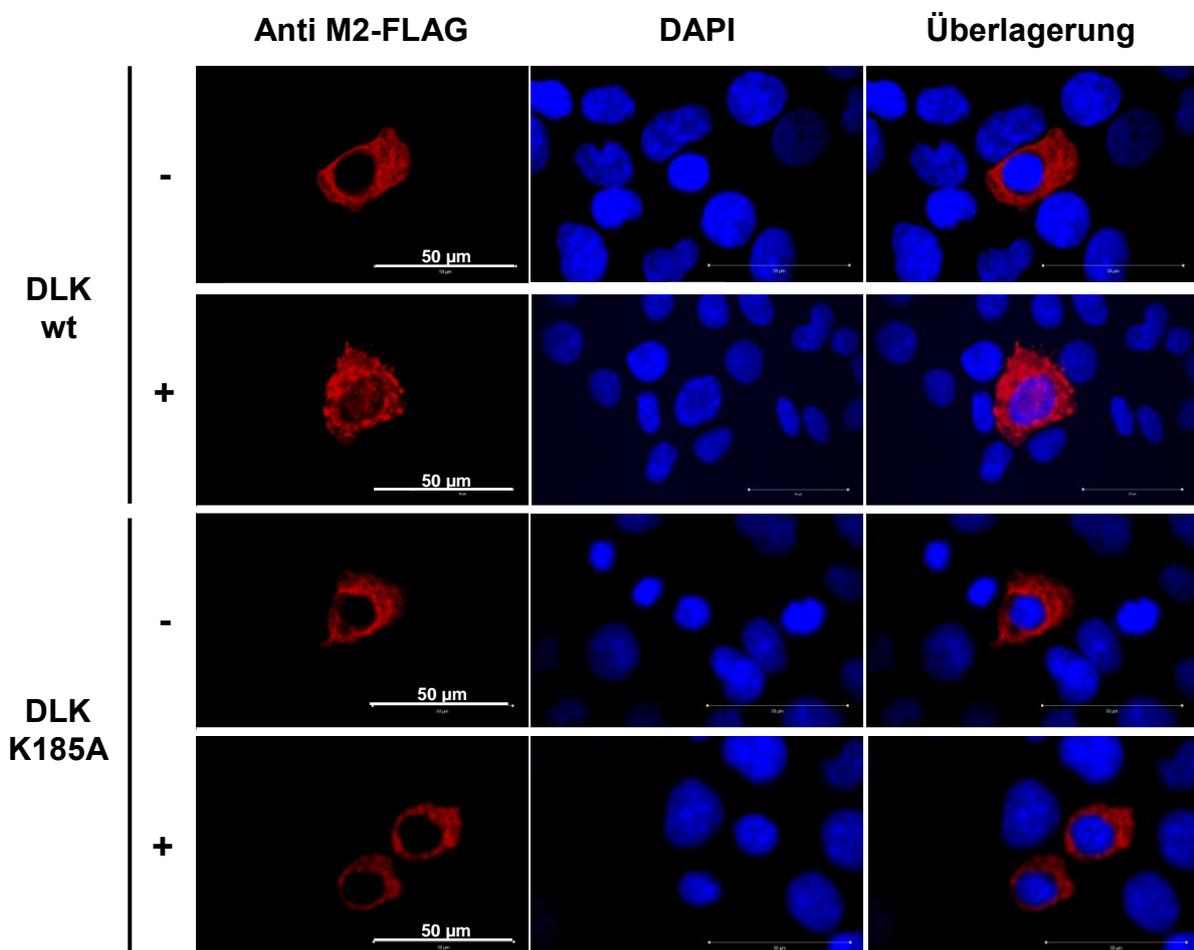


Abbildung 3.9: Subzelluläre Lokalisation der DLK in JEG-3 Zellen. JEG-3 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK K185A transfiziert und für 60 min mit $TNF\alpha$ (10 ng/mL) behandelt (+). Oben, repräsentative Aufnahmen einer Immunfluoreszenz-Färbung. Linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (DLK); mittlere Spalte, DNA-Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild.

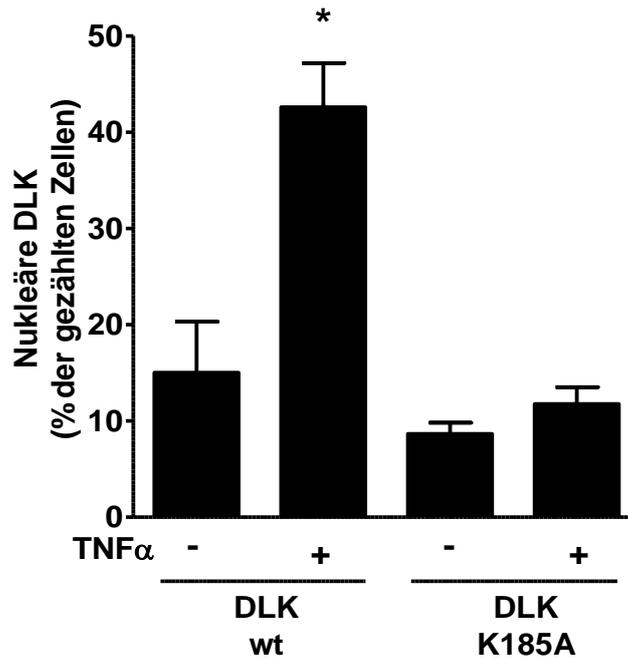


Abbildung 3.10: Quantitative Auswertung der nukleären DLK-Lokalisation in JEG-3 Zellen. JEG-3 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK K185A transfiziert und für 60 min mit TNF α (10 ng/mL) behandelt (+). Quantitative Auswertung als prozentualer Anteil der Zellen mit nukleärer DLK in allen DLK positiven Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung. *p<0,05; t-Test.

3.1.3 Zusammenfassung

Aus diesen Daten ist zu erheben, dass die Mutation des nukleären Exportsignals (NES) innerhalb der DLK zu keiner Veränderung in der Phosphorylierung der untergeordneten Kinase JNK und in der mit KCl- und TNF α -stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription - verglichen mit dem DLK wt - führt.

TNF α , als prädiabetisches Cytokin, erhöht die nukleäre Lokalisation der überexprimierten DLK wt und DLK NES Mutante, aber nicht die Lokalisation der DLK katalytisch inaktiven Mutante K185A und die Lokalisation eines cytoplasmatischen Proteins (cAMP-Sensor).

Ein längerer Verbleib der DLK im Kern (DLK NES) führt zu einer Erhöhung der β -Zellapoptose. Die Dual Leucine-Zipper Kinase besitzt hiernach ein funktionelles nukleäres Exportsignal (NES). Die endogene Aktivität dieser Kinase in den untersuchten HIT-T15 Zellen kann den erzielten Ergebnissen zufolge vernachlässigt werden.

3.2 Regulation der DLK durch Calcineurin

3.2.1 Phosphorylierung von endogenen DLK und JNK nach Behandlung mit Calcineurininhibitoren

Um den Effekt der Calcineurininhibitoren Ciclosporin (CsA) und Tacrolimus (FK506) auf die Phosphorylierung der endogenen DLK am Ser-302 und auf die Phosphorylierung der untergeordneten Kinase JNK zu untersuchen, wurden HIT-T15 Zellen für 30 min mit 10 μM CsA und 167 nM FK506 behandelt. Hierbei diente $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL für 60 min) als Positivkontrolle (Börchers et al., in Revision). Bisher unveröffentlichte Daten zufolge hemmt Wasserstoffperoxid als reaktive Sauerstoffspezies die Phosphatase Calcineurin (Kutschenko, med. Diss. Göttingen, 2007). Die Wirkung von Wasserstoffperoxid (100 μM für 3 oder 6 min) auf die endogenen Phosphorylierungen von DLK und JNK wurde ebenfalls getestet.

Die Phosphorylierungen der endogenen DLK am Ser-302 sowie der endogenen JNK ließen sich mit $\text{TNF}\alpha$, den Calcineurininhibitoren CsA, FK506 und Wasserstoffperoxid erhöhen (Abbildung 3.11) ohne die endogene DLK-Expression zu beeinflussen.

Diese Daten zeigen, dass Substanzen, die Calcineurin hemmen und/oder JNK phosphorylieren, DLK am Ser-302 phosphorylieren.

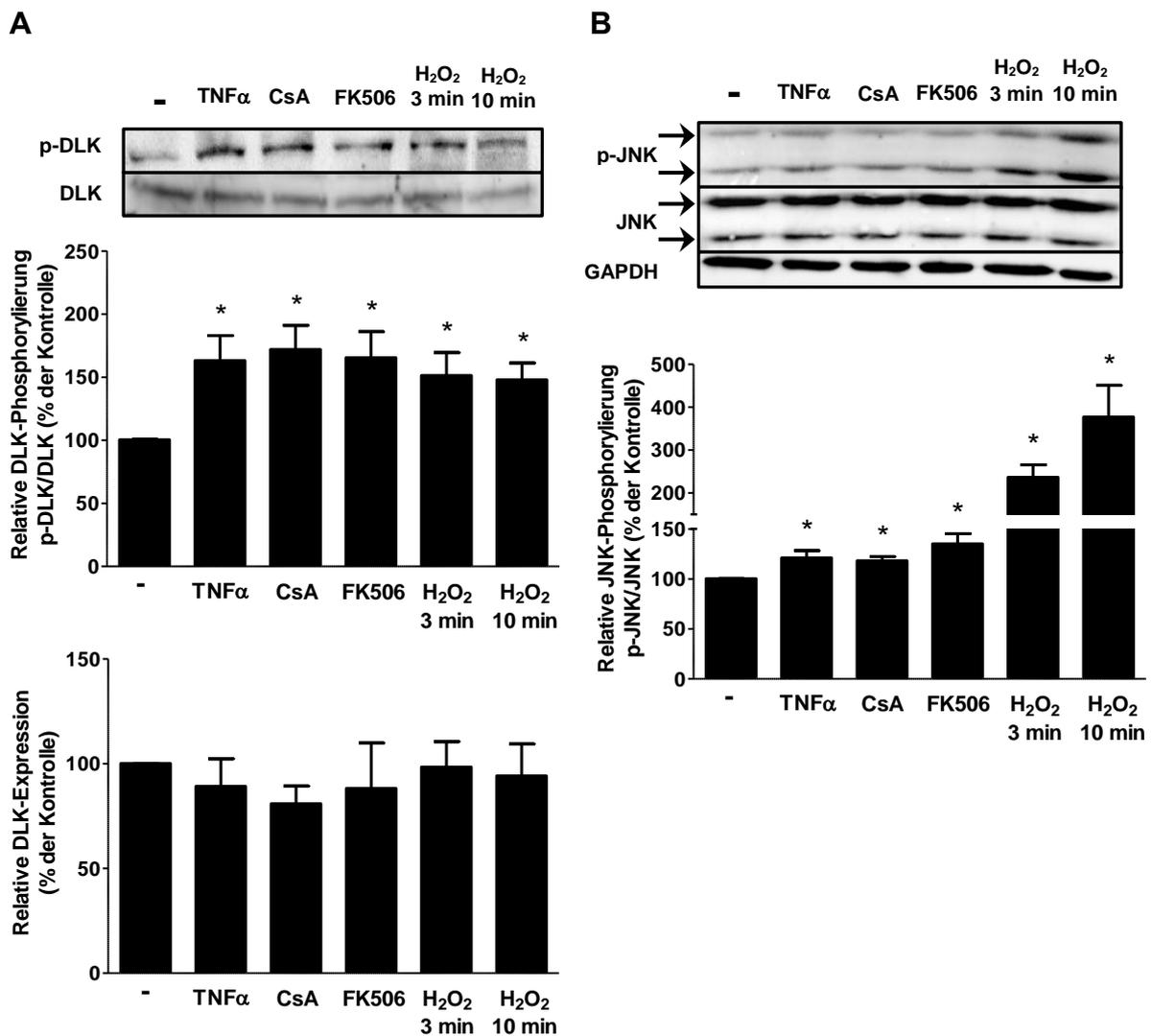


Abbildung 3.11: Phosphorylierungen von endogenen DLK und JNK nach Behandlung mit TNF α und den Calcineurininhibitoren. HIT-T15 Zellen wurden vor der Ernte mit TNF α (10 ng/mL) für 60 min, mit CsA (10 μ M) für 30 min, mit FK506 (167 nM) für 30 min und mit H₂O₂ (100 μ M) für 3 oder 10 min behandelt. **A.** Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen am Ser-302 phosphorylierte DLK und gegen das COOH-Ende der DLK. Mitte, quantitative Auswertung. Die phosphorylierte DLK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind relativ zu der Dichte der DLK repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Unten, quantitative Auswertung der DLK Expression in jedem Experiment. Die DLK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind relativ zu der Dichte der DLK Bande ohne Behandlung „-“. **B.** Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen an Thr-183 und Tyr-185 phosphorylierte JNK, gegen JNK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Die phosphorylierte JNK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der JNK repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Die schwarzen Pfeile bei JNK und p-JNK zeigen die ausgewerteten Banden (46 kDa und 54 kDa). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle „-“; t-Test.

3.2.2 Identifizierung von zwei Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK

Auf Basis von *in silico* Analysen wurden zwei putative Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK identifiziert: 273-PNMLIT-278 (PxIxIT) und 362-LPVP-365 (LxVP) (Martínez-Martínez et al., 2006; Rodríguez et al., 2009).

Mittels *site-directed mutagenesis* wurden das Met-275 und das Iso-277 in der ersten Calcineurin-Interaktionsdomäne in Arg-275 und in Lys-277 (DLK CN1) und das Leu-362 und Val-364 innerhalb der zweiten putativen Interaktionsdomäne jeweils in Ala mutiert (DLK CN2). Zusätzlich wurde eine Doppelmutante aus DLK CN1 und DLK CN2 hergestellt (DLK CND).

Die DLK Mutanten wurden bezüglich der Autophosphorylierung von DLK am Ser-302 und der Phosphorylierung von JNK mit DLK wt (Positivkontrolle) und der DLK K185A (Negativkontrolle) verglichen. Die DLK Mutanten CN1 und CN2 wurden in demselben Ausmaß wie DLK wt exprimiert, zeigten jedoch keine enzymatische Aktivität (Abbildung 3.12). Die Doppelmutante wurde kaum exprimiert.

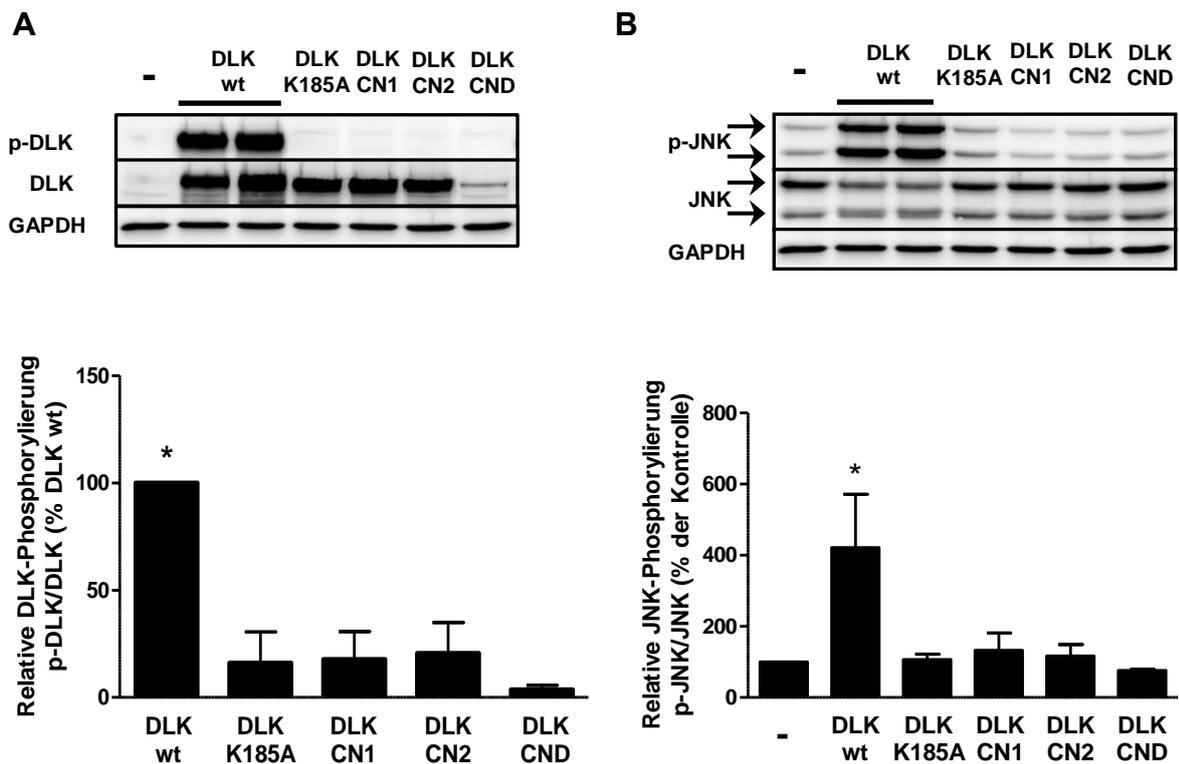


Abbildung 3.12: Vergleich der Phosphorylierung von DLK und JNK durch DLK wt und DLK Mutanten der Calcineurin-Interaktionsdomänen. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK Mutanten der Calcineurin-Interaktionsdomänen transfiziert. **A.** Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen am Ser-302 phosphorylierte DLK, gegen das COOH-Ende der DLK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. **B.** oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen an Thr-183 und Tyr-185 phosphorylierte JNK, gegen JNK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. DLK wt = PNMLIT und LPVP; CN1 = PNRLKT; CN2 = APAP und CND (PNRLKT und APAP, Doppelmutante). Die phosphorylierte JNK und phosphorylierte DLK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der DLK und JNK repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Die schwarzen Pfeile bei JNK und p-JNK zeigen die ausgewerteten Banden (46 kDa und 54 kDa). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; t-Test.

3.2.3 Die LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne

Inspektion der Röntgenkristallstruktur von DLK (Patel et al., 2015) zeigt, dass die erste putative Calcineurin-Interaktionsdomäne mit dem Konsensusmotiv PxlxIT innerhalb der katalytischen Domäne von DLK liegt, sodass Mutationen in diesem Bereich u.a. zu

einer Konformationsänderung der ATP-Bindungstasche und damit zu einem Verlust der Kinaseaktivität führen können (Abbildung 3.13).

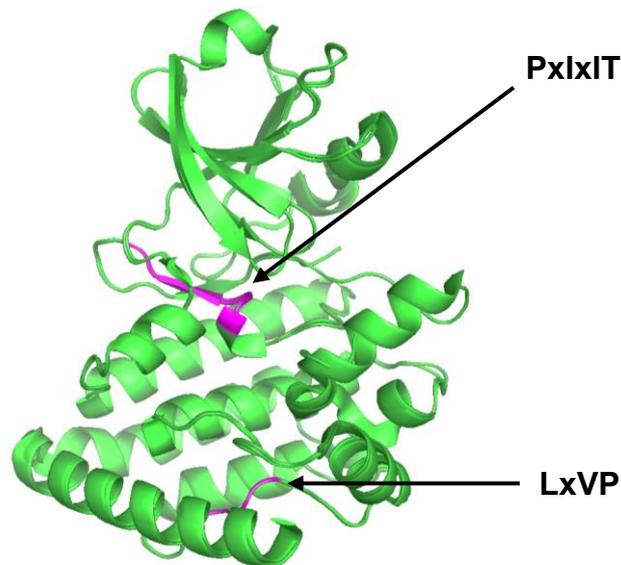


Abbildung 3.13: Die putativen Calcineurin-Interaktionsdomänen in der Röntgenkristallstruktur von DLK (Patel et al., 2015) und die Lokalisation beider Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK (Kooperationspartner Dr. Thomas Lemcke, Molecular Modelling, Institut für Pharmazie, Hamburg).

Die LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne befindet sich auf einer Schleife außerhalb der katalytischen Domäne. Diese Lokalisation könnte die Interaktion mit der Phosphatase Calcineurin begünstigen. Zur weiteren Untersuchung wurden zwei Einzelmutationen der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne (LPVP → **APVP** und **LPAP**) hergestellt, transient in HIT-T15 Zellen transfiziert und mittels Immunoblotanalyse mit DLK CN2 (ihre Doppelmutante **APAP**) verglichen. DLK wt und DLK K185A dienten als Kontrollen.

3.2.3.1 DLK Mutanten der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne

3.2.3.1.a Proteinexpression und enzymatische Aktivität

Die Mutation des Leu-362 zu Ala führte zu einem Verlust der DLK Kinaseaktivität gemessen an der Autophosphorylierung von DLK an Ser-302 und der Phosphorylierung der DLK untergeordneten Kinase JNK (Abbildung 3.14). Im Gegensatz dazu wurde die Val-364-Ala (V364A) Mutante in demselben Ausmaß wie der DLK wt am Ser-302 phosphoryliert. Diese Mutante stimulierte JNK deutlich stärker

(2,2-fach) als der wt, gemessen an der Phosphorylierung von JNK an Thr-183 und Tyr-185 (Abbildung 3.14, B).

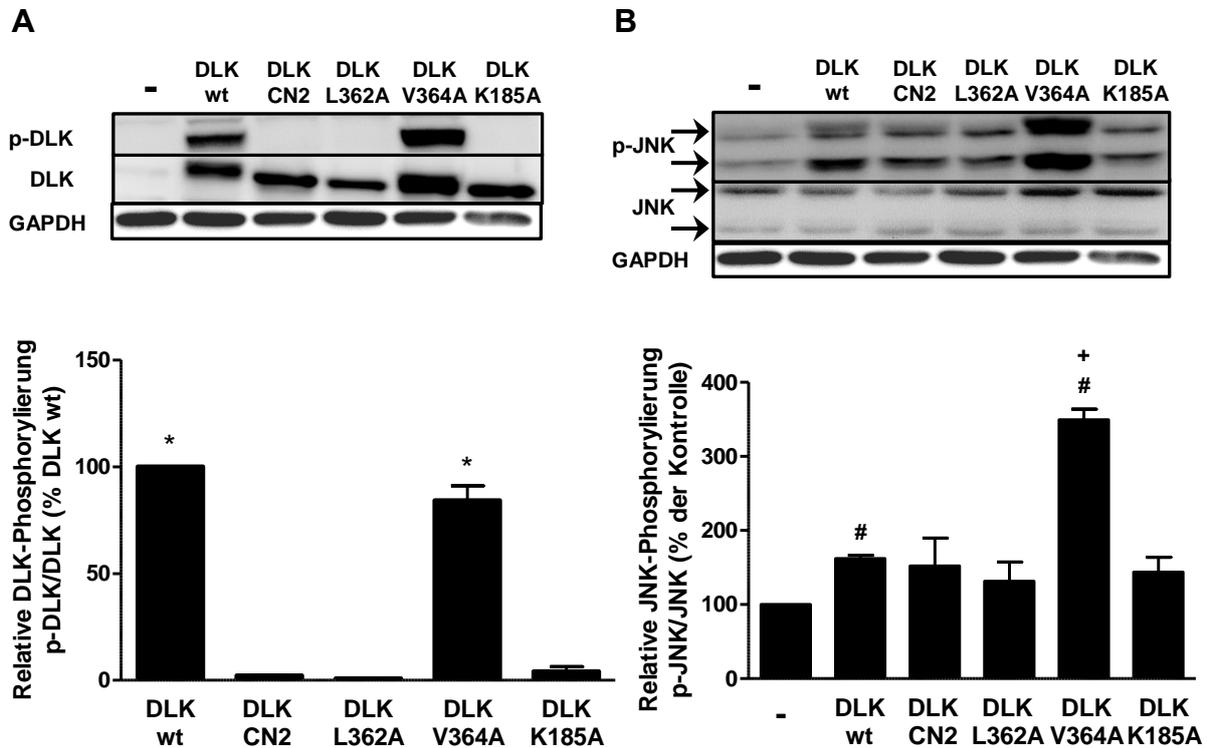


Abbildung 3.14: Vergleich der Phosphorylierung von DLK und JNK durch DLK wt und DLK Mutanten der zweiten Calcineurin-Interaktionsdomäne (LxVP). HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und ihre Mutanten transfiziert. **A.** Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen am Ser-302 phosphorylierte DLK, gegen das COOH-Ende der DLK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. **B.** Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen an Thr-183 und Tyr-185 phosphorylierte JNK, gegen JNK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. DLK wt = LPVP; CN2 = APAP (LxVP Doppelmutante); L362A = APVP; V364A = LPAP. Die phosphorylierte JNK und phosphorylierte DLK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der DLK und JNK repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Die schwarzen Pfeile bei JNK und p-JNK zeigen die ausgewerteten Banden (46 kDa und 54 kDa). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. DLK CN2, L362A, K185A; # $p < 0,05$ vs. Kontrolle „-“; + $p < 0,05$ vs. DLK wt; t-Test.

3.2.3.1.b Protein-Protein Interaktion

Um zu untersuchen, ob LPVP tatsächlich eine Interaktionsdomäne für Calcineurin in der DLK darstellt, wurde eine Protein-Protein Interaktion mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Abbildung 3.15 zeigt, dass der DLK wt und die DLK L362A Mutante mit Calcineurin interagieren. Die Negativkontrolle, MBP (*Maltose Binding*

Protein) ohne Fusionsprotein, dagegen zeigte keine Interaktion. Die DLK V364A aktive Mutante und die LxVP-Doppelmutante (DLK L362A/V364A; DLK CN2) interagierten nicht mit Calcineurin. Die Ergebnisse belegen, dass die Mutation des Val-364 in der LPVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne die Interaktion der DLK mit Calcineurin verhinderte.

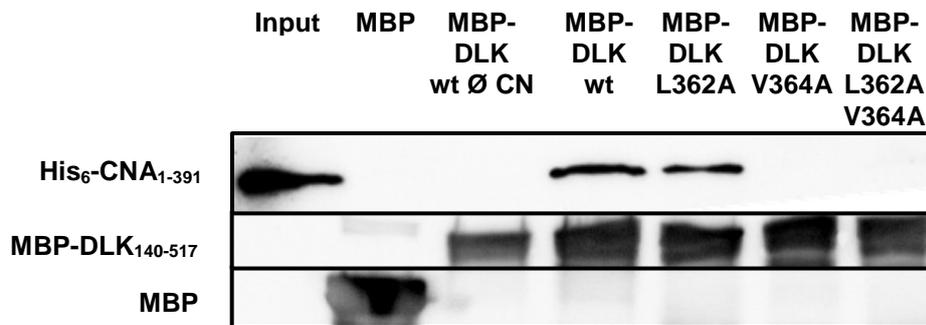


Abbildung 3.15: Rekombinantes MBP-DLK V364A Protein interagiert nicht mit rekombinant hergestelltem Calcineurin. Die gereinigten MBP-DLK Fusionsproteine (MBP-TEV-DLK wt, MBP-TEV-DLK V364A, MBP-TEV-DLK L362A und MBP-TEV-DLK L362A/V364A) wurden an Amylose-Harzen gebunden und für 2 - 3 h mit gereinigtem His₆-markiertem Calcineurin Protein (CN = CNA₁₋₃₉₁/CNB₁₋₁₇₀) inkubiert. Die Interaktion der MBP-DLK Fusionsproteine und His₆-Calcineurin wurde mittels Immunoblotanalyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen His₆ nachgewiesen. Ein Antikörper gegen MBP für die MBP-DLK Fusionsproteine zeigte ähnliche Mengen an eingesetzten Proteinen (Kontrolle der Proteinmengen und der Bindungsaffinität am Amylose-Harz). 5% des zur Interaktion eingesetzten rekombinant hergestellten Calcineurin wurde zur Kontrolle der Interaktionseffizienz als Input geladen.

3.2.3.1.c *Kompetition-Assay mit Oligopeptiden*

Um die Spezifität der Interaktion zwischen DLK und Calcineurin über das Val-364 innerhalb der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne zu verifizieren, wurde ein Kompetition-Assay mit synthetisch hergestellten 15-mer LxVP-basierten Peptiden durchgeführt. Hierbei wurde mittels einer Protein-Protein Interaktion überprüft, ob die Calcineurin-DLK Bindung durch Kompetition um die Calcineurin-Bindungsstelle mit einem Peptid der LxVP-Sequenz (Peptid wt) aufgehoben werden konnte.

Abbildung 3.16 zeigt, dass die Interaktion zwischen DLK wt und Calcineurin durch überschüssige Mengen eines Peptids, das die Aminosäuren der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne innerhalb der DLK beinhaltet, vermindert wurde. Das mutierte und das „scrambled“ LxVP-Peptid konnten diese Interaktion nicht beeinflussen.

Peptid wt: Ac-G-S-N-S-L-H-L-P-V-P-S-S-C-P-D-CONH₂
Peptid V364A: Ac-G-S-N-S-L-H-L-P-A-P-S-S-C-P-D-CONH₂
Peptid Scrambled: Ac-L-H-N-P-D-G-P-S-S-V-C-S-P-L-S-CONH₂

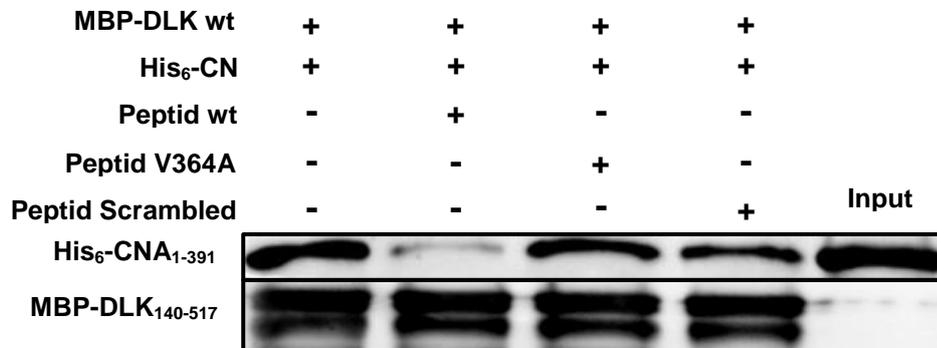


Abbildung 3.16: Aufhebung der DLK-Calcineurin Interaktion mittels eines LxVP-Peptides. Das gereinigte MBP-DLK wt Fusionsprotein (MBP-TEV-DLK wt) wurde an Amylose-Harzen gebunden und für 2 - 3 h mit einer Mischung aus 2 µg gereinigtem His₆-markiertem Calcineurin Protein (CN = CNA₁₋₃₉₁/CNB₁₋₁₇₀) und dem 10-fachen Überschuss an 15-mer Peptiden der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne inkubiert. Die Interaktion der MBP-DLK wt und His₆-Calcineurin Fusionsproteine wurde mittels Immunoblotanalyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen His₆ nachgewiesen. Ein Antikörper gegen MBP zeigte ähnliche Mengen an eingesetzten Proteinen (Kontrolle der Proteinmengen und der Bindungsaffinität am Amylose-Harz). 5% des zur Interaktion eingesetzten rekombinant hergestellten Calcineurin wurde zur Kontrolle der Interaktionseffizienz als Input geladen.

3.2.3.1.d Stimulusinduzierte CRE/CREB-abhängige Gentranskription

Die Wirkung der DLK Mutanten der zweiten Calcineurin-Interaktionsdomäne (LxVP) auf die stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription wurde in Luciferase-Reportergergen-Assays untersucht. Hierbei wurden 1 µg der Expressionsvektoren in HIT Zellen transient mit 1 µg des zu untersuchenden Luciferase-Reportergergens transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen entweder unbehandelt, mit KCl (40 mM) oder mit dem Aktivator der Adenylycyclase Forskolin (10 µM) behandelt. KCl vermittelt in den Zellen einen durch Membrandepolarisation erhöhten Calcium-Einstrom (Ca²⁺-abhängiger Stimulus). Forskolin führt über die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA; cAMP-abhängiger Stimulus). Die stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription ließ sich durch Überexpression von DLK wt und der DLK V364A Mutante im selben Ausmaß inhibieren. Eine Überexpression der anderen Mutanten DLK L362A, DLK CN2 und der negativen

ERGEBNISSE

Kontrolle DLK K185A führte zu keiner Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription (Abbildung 3.17).

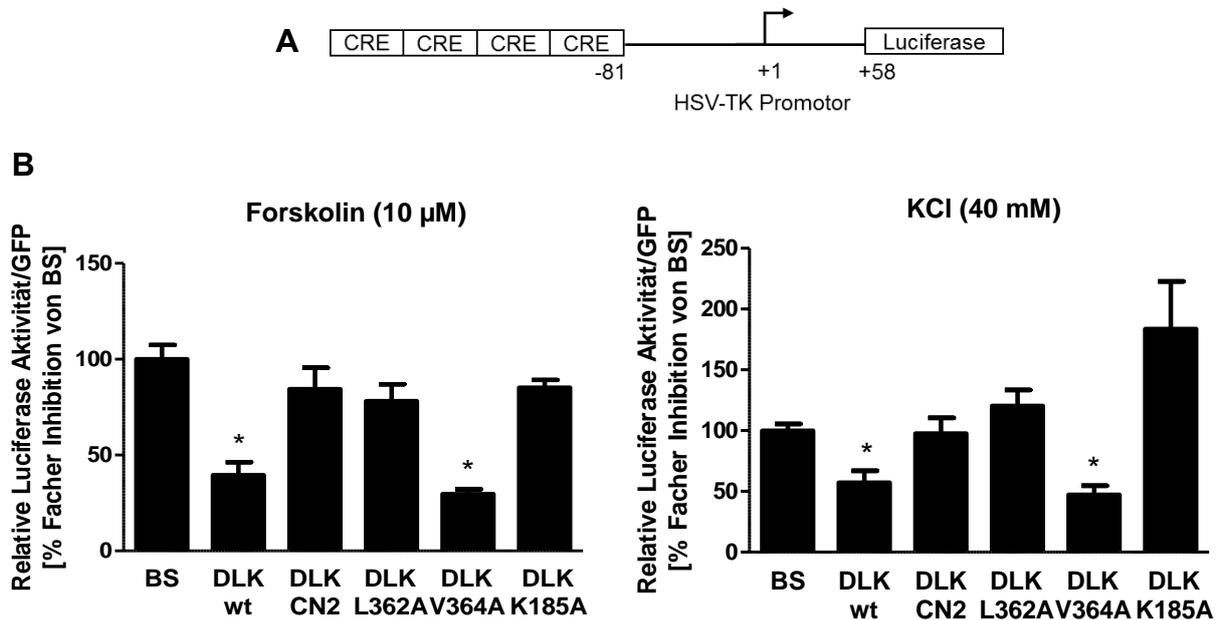


Abbildung 3.17: DLK V364A Mutante hemmte die stimulusinduzierte CRE-abhängige Gentranskription. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert. Bluescript (Leervektor) und die Expressionsvektoren für DLK wt und die DLK Mutanten wurden kotransfiziert. **A.** Schematische Darstellung des Luciferase-Reportergens (4xSomCRE-Luc). **B.** Links; nach 48 h wurden die Zellen 6 h vor der Ernte mit Forskolin (10 µM) behandelt. Rechts; nach 48 h wurden die Zellen 6 h vor der Ernte mit KCl (40 mM) behandelt. Die Luciferase-Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne Forskolin/KCl-Behandlung in jeder Gruppe. Die Mittelwerte der %-Hemmung ± SEM der drei unabhängigen Experimente, jeweils in Doppelbestimmung, sind relativ zu den Mittelwerten der %-Hemmung von Bluescript (BS, Leervektor, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS; t-Test.

Die DLK V364A Mutante schien die CRE-abhängige Gentranskription tendenziell stärker zu inhibieren als der DLK wt. Zwecks genauerer Untersuchung, wurde der Effekt von DLK wt und DLK V364A auf die synergistisch stimulierte CRE-abhängige Gentranskription beobachtet.

Um die Auswirkung der DLK V364A Mutante auf die transkriptionelle Aktivität von CREB zu spezifizieren, wurde die synergistisch stimulierte CREB-abhängige Gentranskription ebenfalls untersucht.

Die mit KCl und Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription wurde durch Überexpression von DLK wt und, in einem stärkeren Ausmaß, von DLK V364A

ERGEBNISSE

gehemmt (Abbildung 3.18, A). Des Weiteren wurde die stimulierte CREB-abhängige Gentranskription durch Überexpression von DLK V364A in einem stärkeren Ausmaß gehemmt als durch den DLK wt (Abbildung 3.18, B). Eine Überexpression der Mutanten DLK L362A, DLK CN2 und der Negativkontrolle DLK K185A veränderte die Basalaktivität der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription nicht.

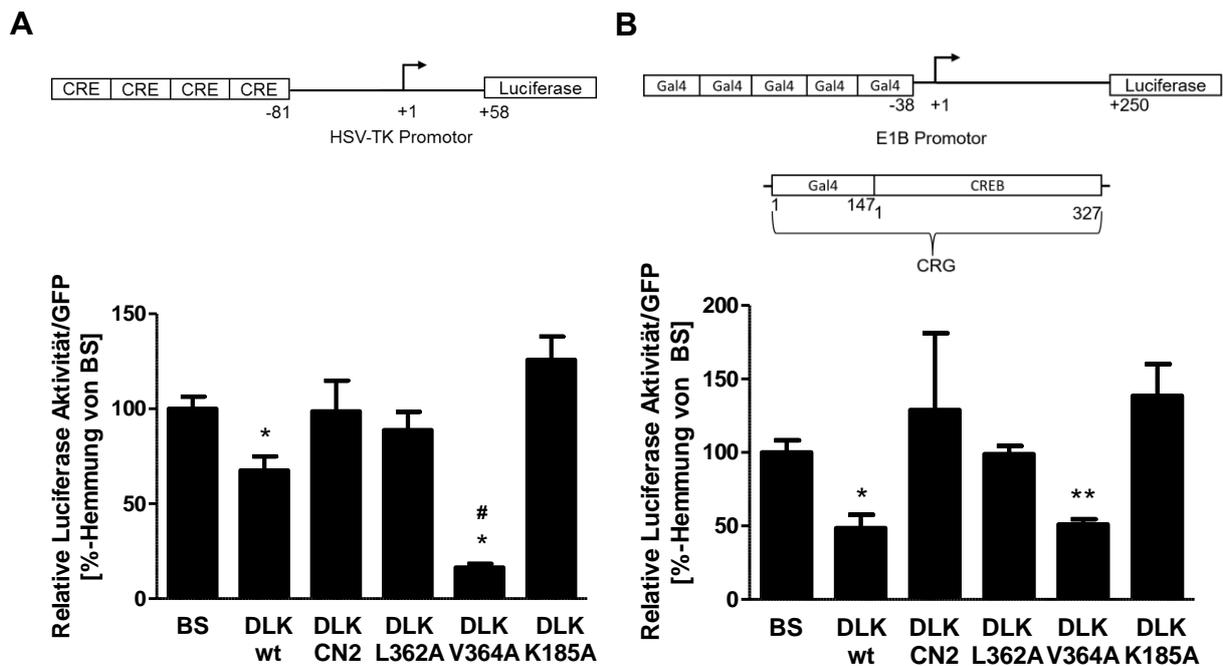


Abbildung 3.18: DLK V364A Mutante zeigte eine stärkere Hemmung der CRE- und CREB-abhängigen Gentranskription. **A.** CRE-abhängig: HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert (oben, schematische Darstellung; unten, quantitative Evaluation). **B.** CREB-abhängig: Kotransfektion von HIT-T15 Zellen mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des E1B-Promotors (-38 bis + 250 bp) und fünf Kopien der DNA-Bindungssequenz für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 und einem Expressionsvektor für Gal4-CREB (CRG) (oben, schematische Darstellung; unten, quantitative Evaluation). Die Zellen wurden 6 h vor der Ernte mit KCl (40 mM) zur Membrandepolarisation und 10 μ M Forskolin (Aktivator der Adenylylcyclase) behandelt. Die Luciferase-Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne Forskolin/KCl-Behandlung in jeder Gruppe. Die Mittelwerte der %-Hemmung \pm SEM der vier unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) sind relativ zu den Mittelwerten der %-Hemmung von Bluescript (BS, Leervektor, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS; # $p < 0,05$ vs. DLK wt; ** $p < 0,005$ vs. BS; t-Test.

ERGEBNISSE

Zur besseren Abschätzung des hemmenden Effekts der CRE-abhängigen Gentranskription durch Überexpression der DLK V364A Mutante in HIT Zellen wurden zunehmende Mengen der Expressionsvektoren von DLK wt und DLK V364A (0,1 µg; 0,3 µg; 1,0 µg und 3,0 µg) transient transfiziert. In diesem Reporter-Gen-Assay hemmte die DLK V364A Mutante dosisabhängig die KCl/Forskolin-induzierte CRE-abhängige Gentranskription stärker als DLK wt (Abbildung 3.19).

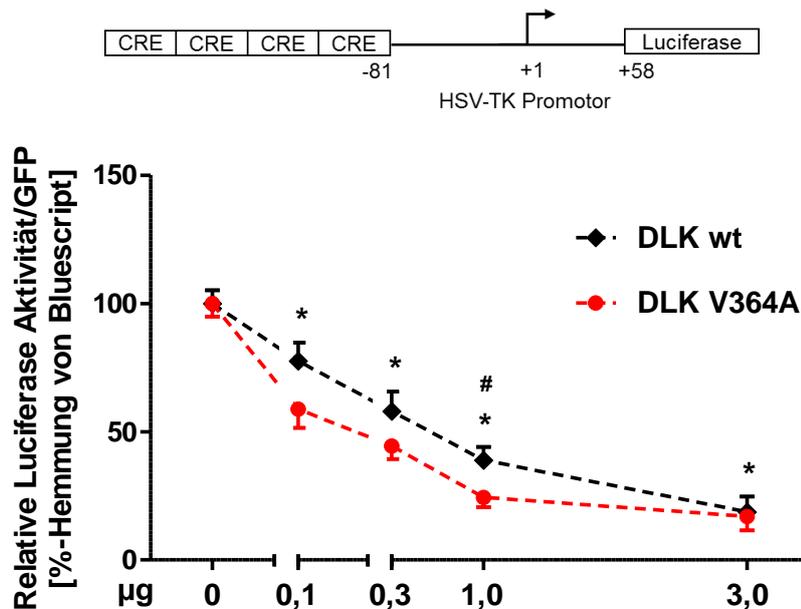


Abbildung 3.19: DLK V364A Mutante zeigte dosisabhängig eine stärkere Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription als DLK wt. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reporter-Gen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (-81 bis +58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert (oben, schematische Darstellung; unten, quantitative Evaluation). Die Zellen wurden 6 h vor der Ernte mit KCl (40 mM) zur Membrandepolarisation und 10 µM Forskolin (Aktivator der Adenylcyclase) behandelt. Die Luciferase-Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne Forskolin/KCl-Behandlung in jeder der untersuchten Plasmidmenge. Die Mittelwerte der %-Hemmung ± SEM der vier unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) sind relativ zu den Mittelwerten der %-Hemmung von Bluescript (Leervektor, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. 0 µg (Dosisabhängigkeit); # $p < 0,05$ vs. DLK wt; t-Test.

3.2.3.2 Die calcineurinbindungsdefiziente DLK V364A Mutante

Die calcineurinbindungsdefiziente DLK V364A Mutante phosphorylierte die untergeordnete Kinase JNK stärker als DLK wt. Darüber hinaus lässt sich die mit KCl und Forskolin stimulierte CRE/CREB-abhängige Gentranskription durch

Überexpression von DLK V364A inhibieren. Die Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription ist durch Überexpression dieser Mutante ausgeprägter als durch die Überexpression von DLK wt.

3.2.3.2.a DLK V364A, subzelluläre Lokalisation und β -Zellapoptose

Um den Effekt der calcineurinbindungsdefizienten Mutante auf die subzelluläre Lokalisation sowie auf die β -Zellapoptose zu untersuchen, wurden die Expressionsvektoren für DLK wt und DLK V364A in HIT-T15 Zellen transient transfiziert und eine immunocytochemische Analyse durchgeführt.

Die Identifikation der überexprimierten DLK wt und DLK V364A in den Zellen gelang mithilfe eines Antikörpers gegen das FLAG-Epitop der Expressionsvektoren. Zur Bestimmung der β -Zellapoptose wurde als Apoptosemarker die fragmentierte Caspase-3 verwendet. DAPI diente der DNA-Kernfärbung.

48 h nach transients Transfektion wurden die Zellen entweder für 60 min mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL), für 30 min mit CsA (10 μM) oder mit FK506 (167 nM), oder für 10 min mit Wasserstoffperoxid (100 μM) behandelt.

Die DLK V364A Mutante zeigt im Vergleich zum DLK wt eine verstärkte nukleäre Translokation sowie β -Zellapoptose. $\text{TNF}\alpha$ und die Calcineurininhibitoren (CsA, FK506, Wasserstoffperoxid) erhöhten die nukleäre Translokation und die β -Zellapoptose nach Überexpression des DLK wt, aber nicht in den mit DLK V364A transfizierten Zellen (Abbildung 3.21).

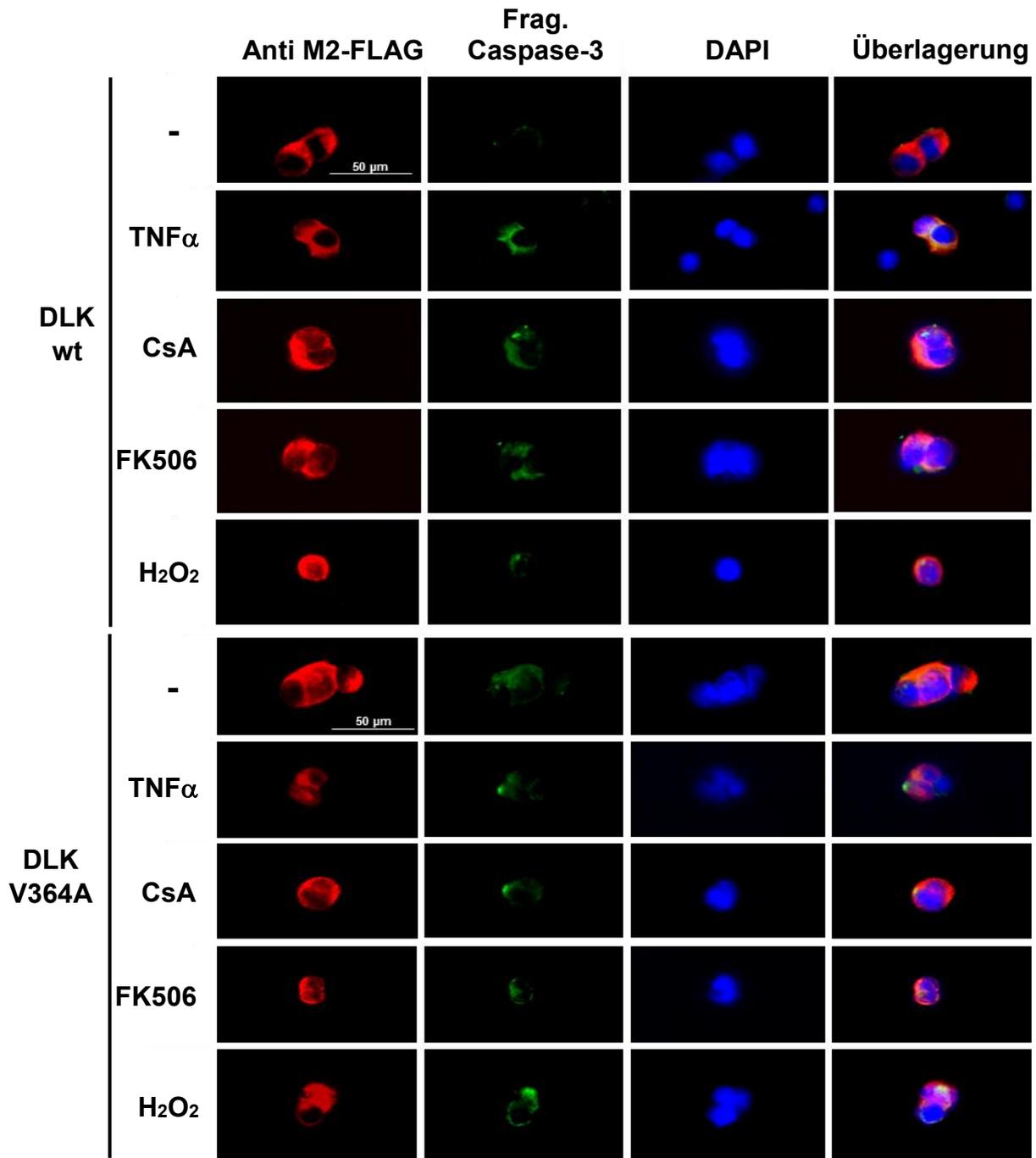


Abbildung 3.20: Exemplarische immunfluoreszenzmikroskopische Bilder der mit DLK wt und DLK V364A transient transfizierten HIT Zellen. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK V364A transfiziert und nach 48 h mit TNF α (10 ng/mL) für 60 min, CsA (10 μ M) für 30 min, FK506 (167nM) für 30 min und H₂O₂ (100 μ M) behandelt, wie angegeben. Linke Spalte, Färbung mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (DLK); mittlere linke Spalte, Färbung mit dem Antikörper gegen die fragmentierte Caspase-3 (Apoptose); mittlere rechte Spalte, DNA-Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild.

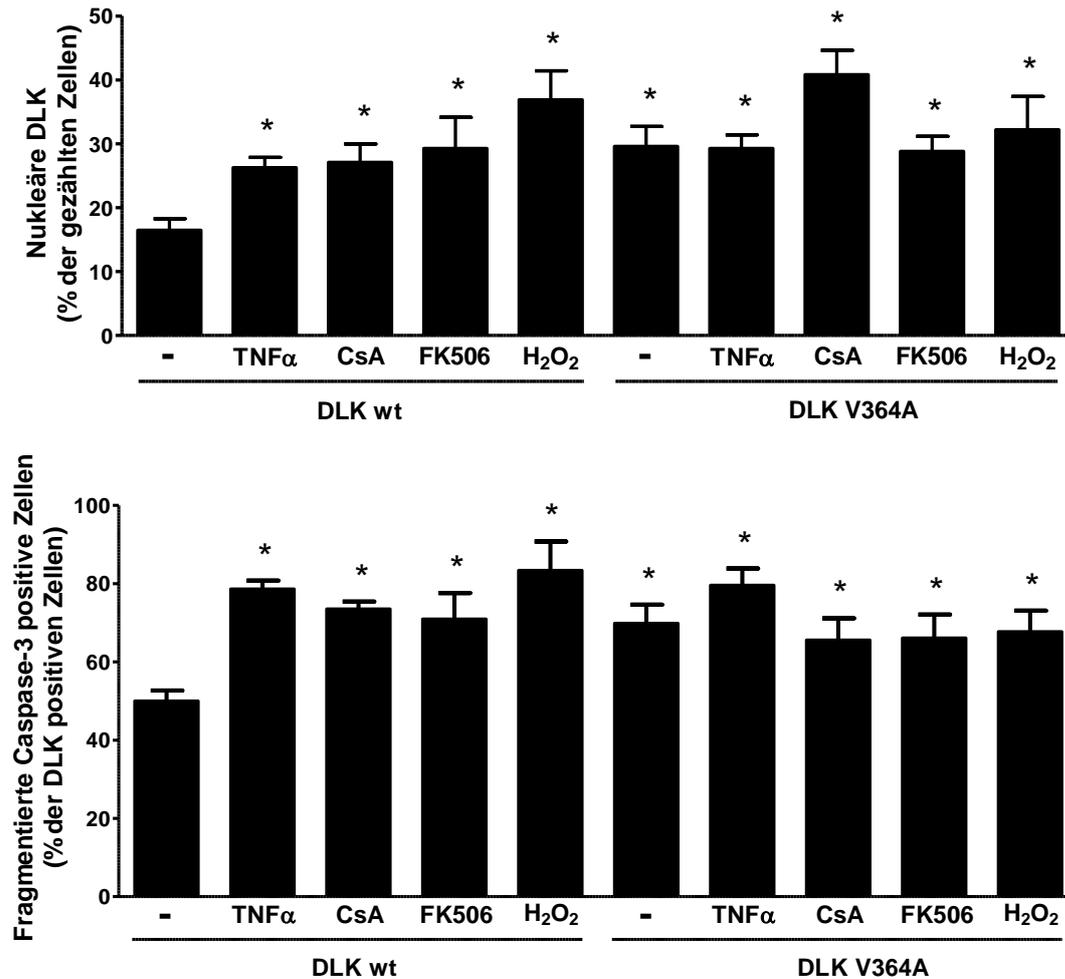


Abbildung 3.21: Auswirkung der calcineurinbindungsdefizienten DLK V364A Mutante auf die nukleäre Lokalisation und auf die β -Zellapoptose. Quantitative Auswertung. Oben, subzelluläre Lokalisation. Die Werte repräsentieren den Prozentsatz der Zellen, die durch den Antikörper gegen das FLAG-Epitop gefärbt waren, welches in den Kernen aller DLK-positiven Zellen sichtbar war. Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. „-“ DLK wt unbehandelte Zellen; t-Test. Unten, Induktion der Apoptose. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die mit dem Antikörper gegen die fragmentierte Caspase-3 von allen DLK positiven Zellen gefärbt wurden. Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. „-“ DLK wt unbehandelte Zellen; t-Test.

3.2.3.2.b DLK V364A und die CRE-abhängige Gentranskription nach Behandlung mit den spezifischen Calcineurininhibitoren CsA und FK506

Die CRE-abhängige Gentranskription wurde durch Überexpression der calcineurinbindungsdefizienten Mutante stärker gehemmt als durch Überexpression von DLK wt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die spezifischen Calcineurininhibitoren Ciclosporin und Tacrolimus keinen zusätzlichen Effekt bezüglich der nukleären Translokation und β -Zellapoptose in den mit DLK V364A transient transfizierten HIT Zellen verursachen. Um zu untersuchen, ob Ciclosporin und Tacrolimus die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription durch Überexpression von DLK wt und DLK V364A beeinflussen, wurden HIT-T15 Zellen mit den Expressionsvektoren für DLK wt und DLK V364A transient transfiziert. Nach 48 h wurden die HIT Zellen für 30 min mit CsA (30 nM) und FK506 (1 nM) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit KCl (40 mM) und Forskolin (10 μ M) als Doppelstimulus stimuliert.

Die mit KCl und Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription wurde durch Überexpression von DLK wt und, in einem stärkeren Ausmaß, von DLK V364A gehemmt, wie in Kapitel 3.2.3.1.d gezeigt. Die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren hemmte die basale CRE-abhängige Gentranskription und führte zu einer Zunahme des hemmenden Effekts bei DLK wt und DLK V364A (Abbildung 3.22).

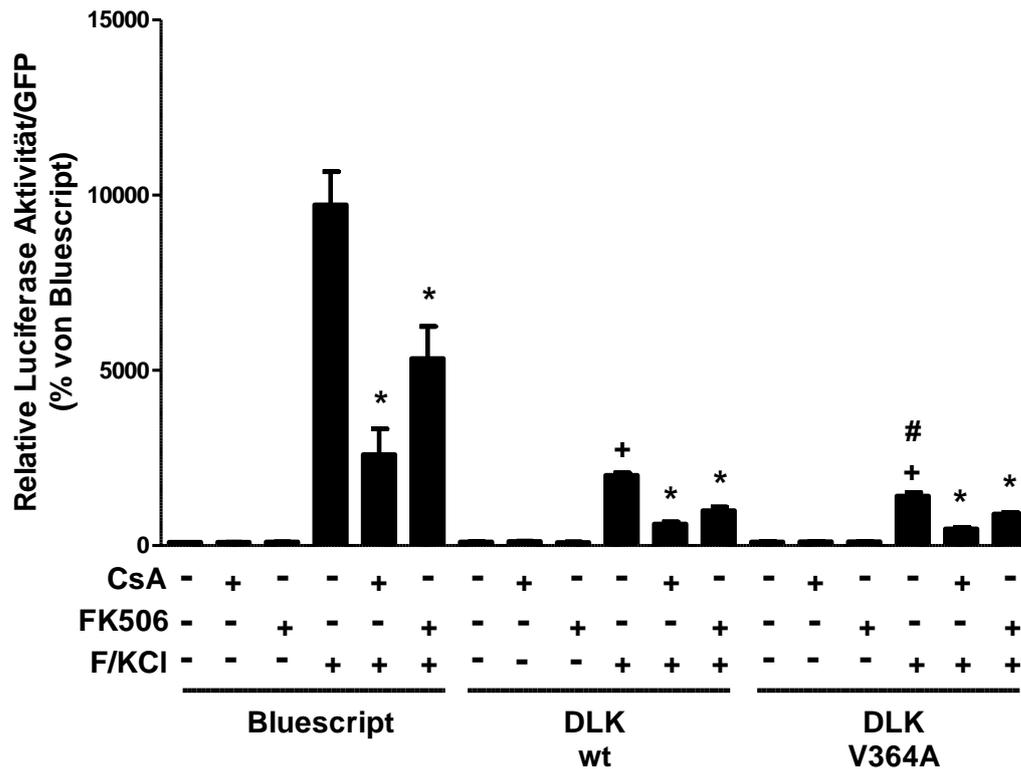


Abbildung 3.22: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Calcineurininhibitoren CsA und Tacrolimus in HIT Zellen. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE des Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert. Die Expressionsvektoren für den Leervektor (Bluescript), DLK wt und DLK V364A wurden kotransfiziert. Die Zellen wurden mit CsA (30 nM) oder Tacrolimus (1 nM) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit KCl (40 mM) und Forskolin (10 μ M) für 6 h stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM der drei unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript unbehandelt in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506 in jeder Gruppe; + $p < 0,05$ vs. Bluescript stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506; # $p < 0,05$ vs. DLK wt stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506; t-Test.

Um sicherzustellen, dass die endogene DLK-Aktivität in den HIT-T15 Zellen den durch die Calcineurininhibitoren vermittelten hemmenden Effekt der CRE-abhängigen Gentranskription beeinflusst, wurde das obige Experiment in JEG-3 Zellen, einer DLK negative Zelllinie, durchgeführt.

Die Forskolin/KCl-stimulierte basale CRE-abhängige Gentranskription ließ sich mit CsA und FK506 wie in den HIT Zellen inhibieren. Die Überexpression von DLK wt hemmte die stimulierte CRE-abhängigen Gentranskription. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren nicht verstärkt werden. Die Überexpression der DLK V364A Mutante inhibierte die CRE-abhängige

Gentranskription deutlich stärker als DLK wt. Hierbei zeigte die Behandlung mit den Calcineurininhibitoren einen zusätzlichen hemmenden Effekt (Abbildung 3.23).

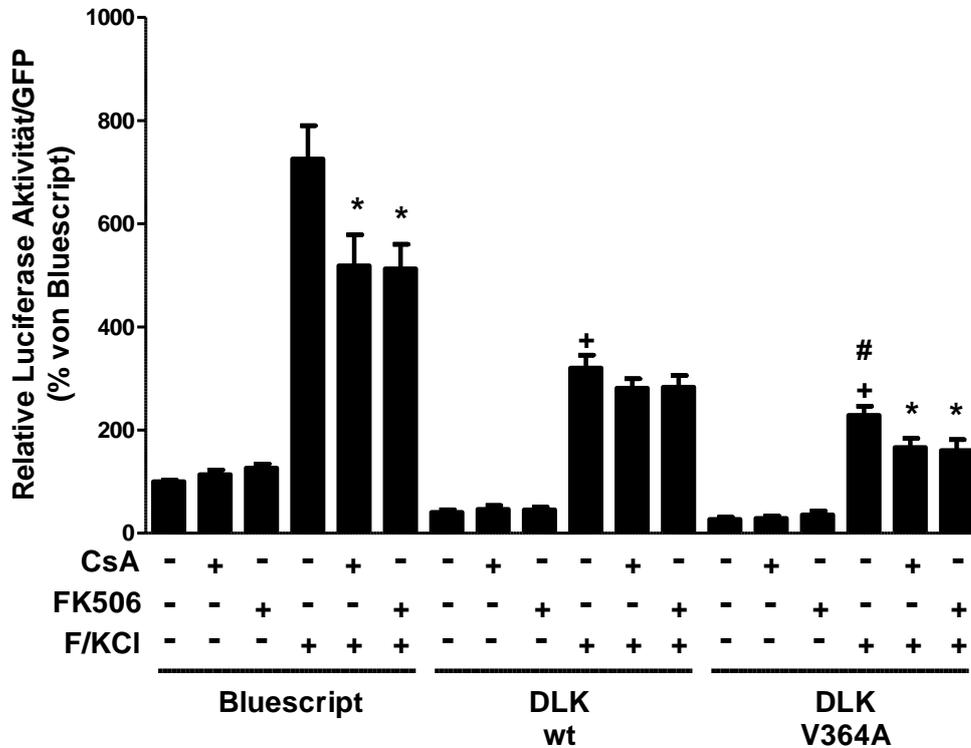


Abbildung 3.23: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Calcineurininhibitoren CsA und Tacrolimus in JEG Zellen. JEG-3 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE des Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert. Die Expressionsvektoren für den Leervektor (Bluescript), DLK wt und DLK V364A wurden kotransfiziert. Die Zellen wurden mit CsA (30 nM) oder Tacrolimus (1 nM) für 30 min vorbehandelt und anschließend für 6 h mit KCl (40 mM) und Forskolin (10 µM) stimuliert. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM der drei unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript unbehandelt und unstimuliert in jedem Experiment. *p<0,05 vs. stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506 in jeder Gruppe; +p<0,05 vs. Bluescript stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506; #p<0,05 vs. DLK wt stimuliert, keine Behandlung mit CsA und FK506; t-Test.

3.2.3.3 JNK-Signalweg

Die Aktivierung der c-Jun N-terminale Kinase-(JNK)-Signalkaskade durch die im prädiabetischen Zustand vorkommenden Cytokine induziert eine verstärkte Apoptose (Donath et al., 2003; Shoelson et al., 2006). Des Weiteren schützt die Hemmung des

JNK-Signalweges die pankreatische β -Zelle vor der cytokinvermittelten Apoptose (Ammendrup et al., 2000; Bonny et al., 2000; Bonny et al., 2001).

Die DLK aktiviert JNK durch Phosphorylierung an Thr-183 und Tyr-185, wodurch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun an Ser-63 und Ser-73 induziert wird. Diese stimulierte c-Jun transkriptionelle Aktivität trägt wiederum zur Neurodegeneration bei (Oetjen und Lemcke, 2016). c-Jun gehört zu der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren, welche sich in Jun (z.B.: c-Jun), Fos (z.B.: c-Fos) und ATF-2 unterteilen lassen (Angel und Karin, 1991). Da der JNK-Signalweg die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun kontrolliert, könnte diese Kaskade die β -Zellapoptose beeinflussen (Ventura et al., 2003).

3.2.3.3.a c-Jun Phosphorylierung und c-Jun-abhängige Gentranskription

Die DLK V364A Mutante phosphoryliert JNK stärker als DLK wt. Um den Einfluss der DLK Mutante auf den JNK-Signalweg aufzuklären, wurde die Phosphorylierung von c-Jun an Ser-73 mit und ohne Behandlung mit dem Calcineurininhibitor Ciclosporin (jeweils mit und ohne KCl-Stimulus) mittels Immunoblot untersucht. Darüber hinaus wurde die c-Jun-abhängige Gentranskription in einem Luciferase-Reportergen-Assay beobachtet.

Abbildung 3.24 zeigt, dass die Behandlung des überexprimierten DLK wt mit Ciclosporin, KCl sowie einer Kombination der beiden die Phosphorylierung von c-Jun tendenziell steigert (CsA: $140,8 \pm 33,00\%$; KCl: $170,1 \pm 29,33\%$; CsA/KCl: $202,7 \pm 97,66\%$).

Die überexprimierten DLK Mutanten der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne phosphorylierten c-Jun in demselben Ausmaß mit und ohne Behandlung mit CsA und KCl. Die basale c-Jun-Phosphorylierung durch Überexpression der DLK V364A Mutante scheint stärker ausgeprägt zu sein (1,7-fach) als die Phosphorylierung von c-Jun durch DLK wt.

Die c-Jun-abhängige Gentranskription wurde weder durch die Überexpression des DLK wt noch durch die Überexpression der DLK LxVP-Mutanten beeinflusst.

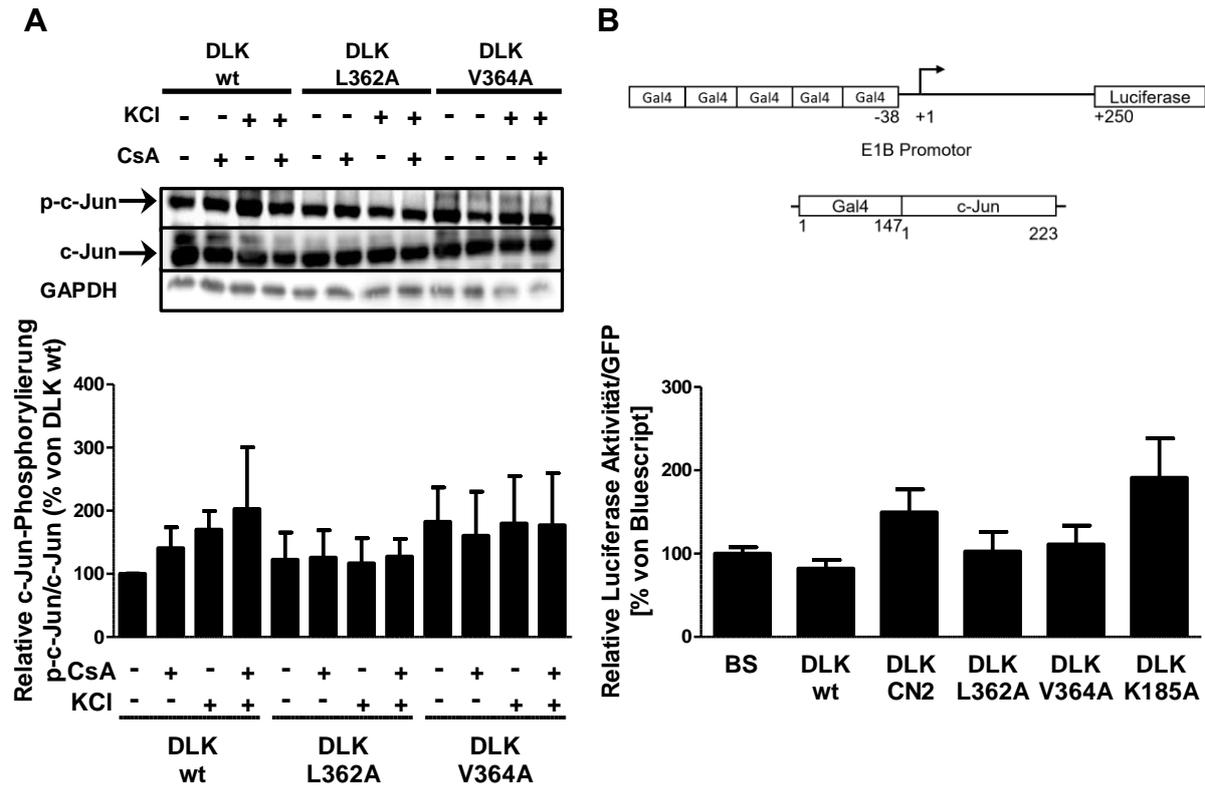


Abbildung 3.24: Die DLK Mutanten der LxVP-Calcineurin-Interaktionsdomäne zeigten keine Unterschiede in Bezug auf die Phosphorylierung von c-Jun und auf die c-Jun-abhängige Gentranskription verglichen mit DLK wt. A. HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt, DLK L362A und DLK V364A transfiziert. 30 min vor der Ernte wurden die Zellen mit CsA (5 µM) oder 15 min vor der Ernte mit KCl (40 mM) behandelt, wie angegeben. Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen am Ser-73 phosphorylierten c-Jun, gegen c-Jun und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. Die phosphorylierte c-Jun repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der c-Jun repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Die schwarzen Pfeile bei c-Jun und p-c-Jun zeigen die ausgewerteten Banden (48 kDa). **B.** Kotransfektion von HIT-T15 Zellen mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des E1B-Promotors (- 38 bis + 250 bp) und fünf Kopien der DNA-Bindungssequenz für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 und einem Expressionsvektor für Gal4-c-Jun (oben, schematische Darstellung). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM der vier unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript (BS, Leervektor, Kontrolle) in jedem Experiment.

3.2.3.3.b c-fos-abhängige Gentranskription

Die Expression des an der Apoptose beteiligten c-Fos ist vermindert, sobald der JNK-Signalweg gehemmt wird (Abdelli et al., 2007). Des Weiteren wird die c-fos Transkription durch den ELK-1 Transkriptionsfaktor, welcher ein JNK-Target darstellt,

reguliert (Cavigelli et al., 1995). Ferner ist bekannt, dass die c-Fos Expression durch prädiabetische Signale wie beispielsweise IL-1 β induziert wird (McDaniel et al., 1996). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die DLK als übergeordnete Kinase über die JNK-Phosphorylierung auf die c-fos transkriptionelle Aktivität ausübt, wurde die c-fos-abhängige Gentranskription unter Verwendung eines Luciferase-Reportergens unter der Kontrolle des 760 bp langen c-fos Genpromotors analysiert (Abbildung 3.25).

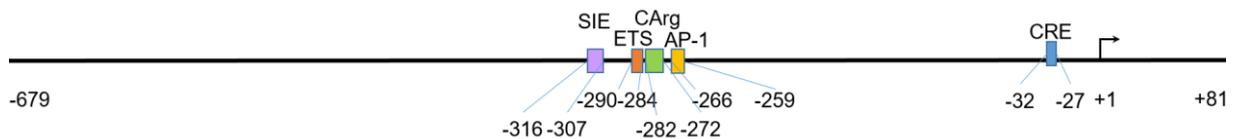


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung des c-fos Genpromotors. Der c-fos Genpromotor besitzt fünf gut untersuchte Bindungsdomänen. CRE: *cAMP response element*; AP-1: Activator Protein-1; CArg: sarcomeric actin promoter element; ETS: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; SIE: c-sis inducible element. Die Zahlen geben die Basenpaare an, wo sich die Bindungsdomänen im Promotor befinden. +1 = Transkriptionsstartpunkt; +81 = 3'-Ende; -679 = 5'-Ende.

Die c-fos-abhängige Gentranskription wurde zunächst ohne jegliche Stimulation untersucht, um den Effekt der Überexpression von DLK wt, DLK V364A als aktivere Mutante und K185A als katalytisch inaktive Mutante zu erfassen. Zusätzlich wurde eine Titration mit zunehmenden Mengen der Expressionsvektoren für DLK wt und DLK V364A (0,1 μ g; 0,3 μ g und 1,0 μ g) durchgeführt, um einen dosisabhängigen Effekt zu beobachten.

Die Überexpression von DLK wt, DLK V364A und DLK K185A führte zur Aktivierung der c-fos-abhängigen Gentranskription (wt: $257,2 \pm 13,27\%$; V364A: $243,8 \pm 8,05\%$; K185A: $158,3 \pm 5,29\%$). Hierbei stimulierten DLK wt und DLK V364A die c-fos-abhängige Gentranskription stärker als die katalytisch inaktive Mutante (Abbildung 3.26, A). Die Titration mit ansteigenden Mengen von DLK wt und DLK V364A zeigte einen dosisabhängigen Effekt bezüglich der c-fos transkriptionellen Aktivität, jedoch keinen Unterschied zwischen DLK wt und der DLK V364A Mutante (Abbildung 3.26, B).

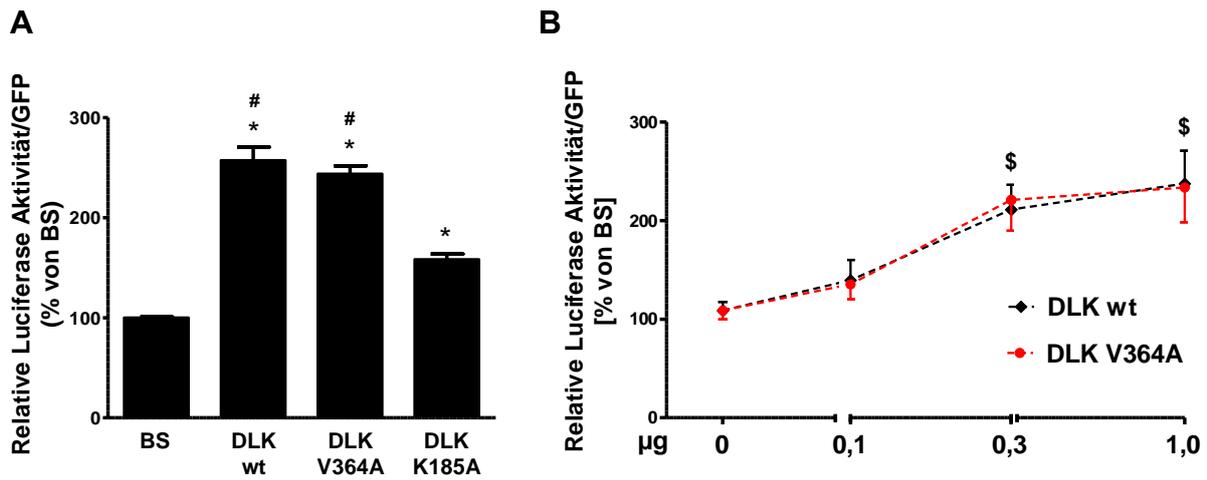


Abbildung 3.26: Transkriptionelle Aktivität des c-fos Genpromotors. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des c-fos Genpromotors (-679 bis +81 bp) transfiziert. **A. Transkriptionelle Aktivität.** Kotransfektion des Leervektors (Bluescript) und der Expressionsvektoren für DLK wt, DLK V364A und DLK K185A. **B. Titration mit ansteigenden Mengen an Expressionsvektoren.** Kotransfektion von absteigenden Mengen des Leervektors (Bluescript) und von ansteigenden Mengen der Expressionsvektoren für DLK wt und DLK V364A. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM der vier unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript (BS, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS; # $p < 0,05$ vs. DLK K185A; \$ $p < 0,05$ vs. 0 μg (Dosisabhängigkeit); t-Test.

Weiterführend wurde die c-fos-abhängige Gentranskription mit KCl und Forskolin als Doppelstimulus (Ca^{2+} -abhängig und cAMP-abhängig) sowie mit dem proinflammatorischen Cytokin $\text{TNF}\alpha$ stimuliert.

Die mit KCl und Forskolin stimulierte c-fos-abhängige Gentranskription wurde durch Überexpression von DLK K185A und, in einem stärkeren Ausmaß, von DLK wt und DLK V364A gehemmt (Abbildung 3.27, A). Eine $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung beeinflusste den aktivierenden Effekt der DLK wt und der DLK Mutanten auf die c-fos-abhängige Gentranskription nicht (Abbildung 3.27, B).

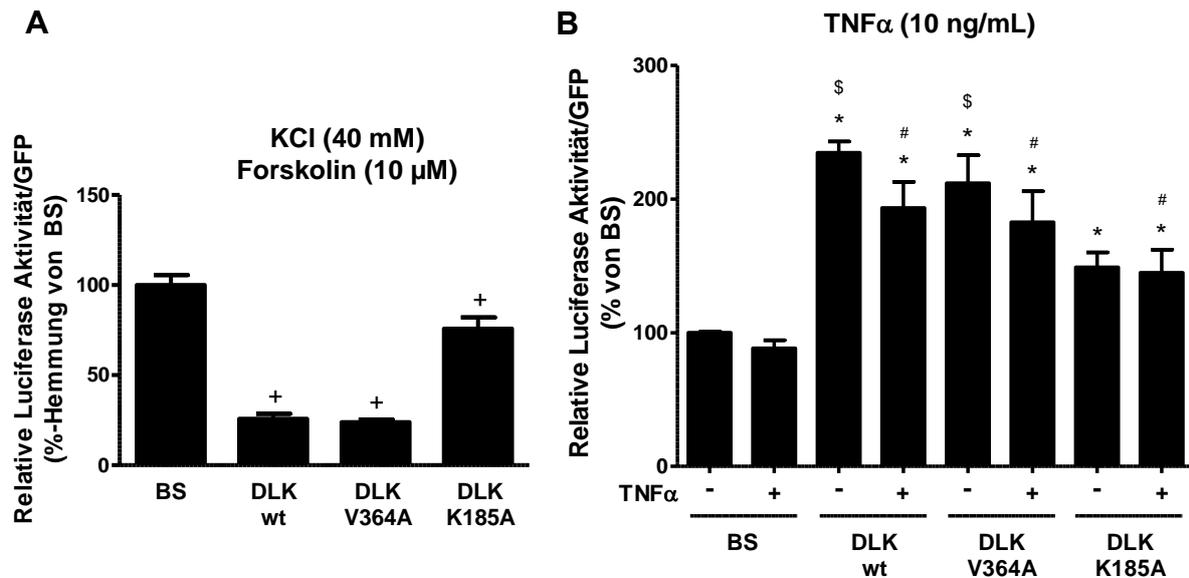


Abbildung 3.27: Stimulierte transkriptionelle Aktivität des c-fos Genpromotors. A. KCI/Forskolin-stimulierte transkriptionelle Aktivität. Kotransfektion des Leervektors (Bluescript) und der Expressionsvektoren für DLK wt, DLK V364A und DLK K185A. Die Zellen wurden 6 h vor der Ernte mit 40 mM KCl zur Membrandepolarisation und 10 μM Forskolin (Aktivator der Adenylylcyclase) behandelt. Die Luciferase-Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne Forskolin/KCl-Behandlung in jeder Gruppe. Die Mittelwerte der %-Hemmung ± SEM der drei unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) sind relativ zu den Mittelwerten der %-Hemmung von Bluescript (BS, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS; t-Test. **B. TNFα-stimulierte transkriptionelle Aktivität.** Kotransfektion des Leervektors (Bluescript) und der Expressionsvektoren für DLK wt, DLK V364A und DLK K185A. Die Zellen wurden 6 h vor der Ernte mit TNFα (10 ng/mL) behandelt. Die Luciferase-Aktivität ist jeweils relativ zum Mittelwert ohne TNFα-Behandlung in jeder Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM der drei unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript (BS, Kontrolle) in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS (-); # $p < 0,05$ vs. BS (+); § $p < 0,05$ vs. DLK K185A; t-Test.

3.2.3.4 Beitrag der DLK L362A Mutante zur Stabilität der Kinase

Die Mutation des Leu-362 zu Ala innerhalb der putativen LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne führte zum Verlust der Kinaseaktivität. Die DLK L362A Mutante wurde in demselben Ausmaß wie DLK wt exprimiert, zeigte jedoch keine Autophosphorylierung von DLK am Ser-302, keine aktivierende Phosphorylierung der untergeordneten Kinase JNK und keine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun. Des Weiteren konnte die DLK L362A Mutante, die CRE/CREB-abhängige Gentranskription nicht hemmen. Diese Mutante interagierte mit Calcineurin in einem Protein-Protein Interaktionsassay.

Die genauere Inspektion der Röntgenkristallstruktur der DLK (Kooperationspartner Thomas Lemcke, Hamburg) zeigte, dass die räumliche Orientierung des Leu-362 für die Stabilität der Kinase von Bedeutung ist (Abbildung 3.28). Leu-362 zeigt aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften in das Innere des Proteins, dort scheint es über Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Tyr-343 und Trp-334 eine Art Komplex in Form einer „Sandwich“-Struktur zu bilden.

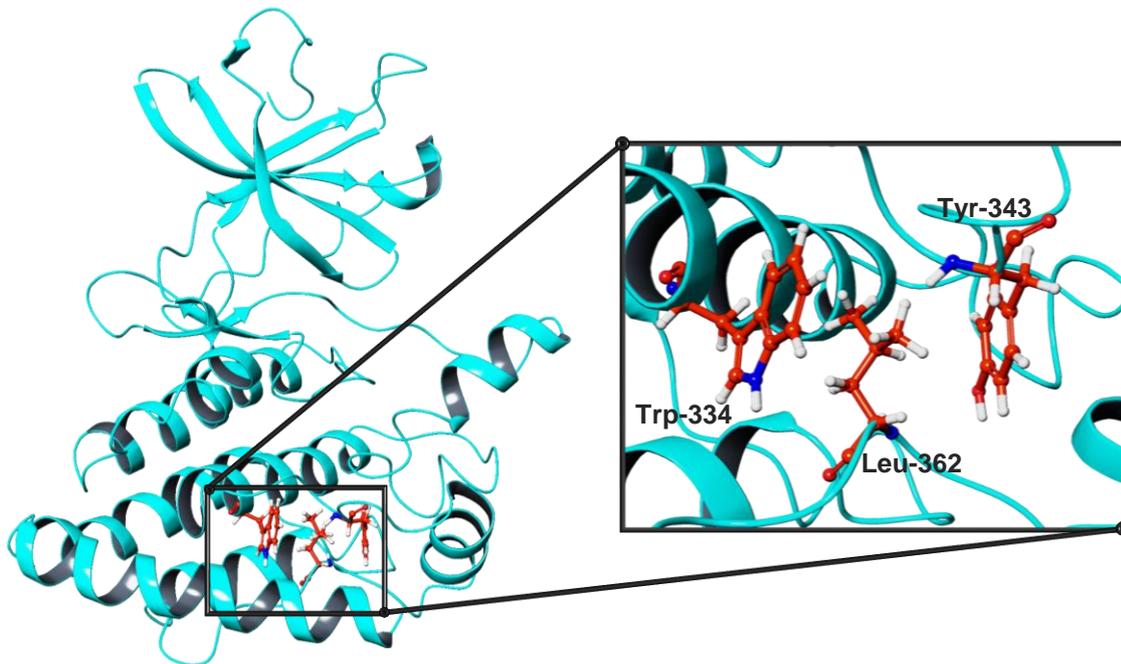


Abbildung 3.28: Die „Sandwich“-Struktur in der Röntgenkristallstruktur von DLK (Patel et al., 2015). Die Wechselwirkungen der Aminosäuren Tryptophan-334 (Trp-334), Leucin-362 (Leu-362) und Tyrosin (Tyr-343) scheinen zur Stabilität des Proteins beizutragen (Mod. Christina Brinker, AG Lemcke, Molecular Modelling, Institut für Pharmazie, Hamburg).

Um zu überprüfen, ob der Verlust der enzymatischen Aktivität der DLK L362A durch das Zusammenbrechen dieser „Sandwich“-Struktur zustande kommt, wurden das Trp-334 und Tyr-343 in Ala mittels *site-directed mutagenesis* mutiert (W334A, Y343A). Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die unpolare Eigenschaften des Leu-362 für die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren eine Rolle spielt. Hierfür wurde das apolare Leu-362 in ein polares Arg (L362R) mutiert.

Die Aminosäure Tryptophan unterscheidet sich von Phenylalanin durch seine OH-Gruppe. Diese OH-Gruppe könnte ebenfalls die Stabilität des Proteins durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen. Ferner könnte die Hydroxyl (OH)-Gruppe eine mögliche Phosphorylierungsstelle für Kinasen darstellen. Infolgedessen wurde die Mutante Y343F (Tyr-343 in Phe) hergestellt.

ERGEBNISSE

Die Expressionsvektoren für die DLK Mutanten L362R, W334A, Y343A und Y343F wurden transient in HIT-T15 Zellen transfiziert und mittels Immunoblotanalyse mit DLK wt verglichen. DLK V364A als aktivere Mutante und die katalytisch inaktive DLK K185A Mutante dienten als Kontrollen. Darüber hinaus wurde die mit KCl und Forskolin stimulierte CRE-abhängige Gentranskription untersucht.

Mit Ausnahme der DLK Y343F führten alle Mutationen zu einem Verlust der DLK Kinaseaktivität gemessen an der Autophosphorylierung von DLK am Ser-302 (Abbildung 3.29) und der Phosphorylierung der DLK untergeordneten Kinase JNK (Abbildung 3.30). Die Autophosphorylierung am Ser-302 und die aktivierende Phosphorylierung von JNK war bei der DLK Y343F Mutante weniger ausgeprägt als die von DLK wt.

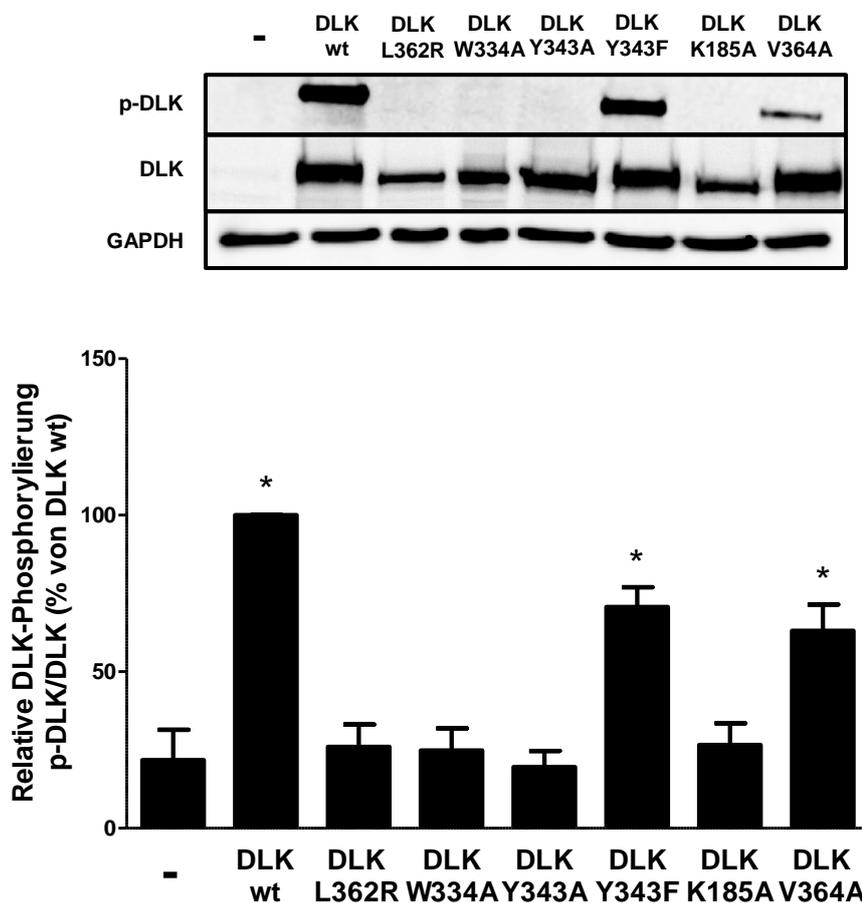


Abbildung 3.29: Vergleich der Phosphorylierung von DLK am Ser-302 durch DLK wt und DLK Mutanten (L362R, W334A, Y343A, Y343F). HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und ihre Mutanten transfiziert. Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen am Ser-302 phosphorylierte DLK, gegen das COOH-Ende der DLK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle „-“; t-Test.

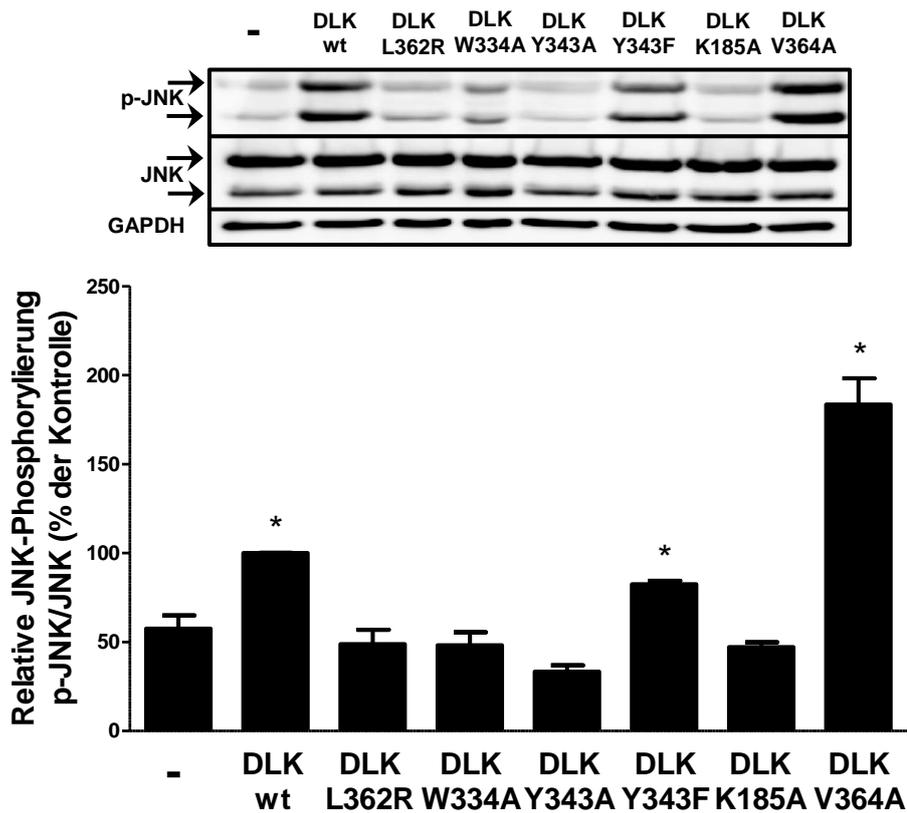


Abbildung 3.30: Vergleich der Phosphorylierung von JNK durch DLK wt und DLK Mutanten (L362R, W334A, Y343A, Y343F). HIT-T15 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für DLK wt und ihre Mutanten transfiziert. Oben, typischer Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen an Thr-183 und Tyr-185 phosphorylierte JNK, gegen JNK und gegen GAPDH als Ladekontrolle. Unten, quantitative Auswertung. Die phosphorylierte JNK und phosphorylierte DLK repräsentierenden Banden wurden densitometrisch ausgewertet und sind jeweils relativ zu der Dichte der DLK und JNK repräsentierenden Banden in jedem Experiment. Die schwarzen Pfeile bei JNK und p-JNK zeigen die ausgewerteten Banden (46 kDa und 54 kDa). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle „-“; t-Test.

Mit Ausnahme der DLK Y343F und DLK V364A führte die Überexpression der DLK Mutanten zu keiner Hemmung der stimulierten CRE-abhängigen Gentranskription. Hierbei zeigte die DLK Y343F Mutante einen weniger stark ausgeprägten inhibitorischen Effekt als DLK wt (Abbildung 3.31).

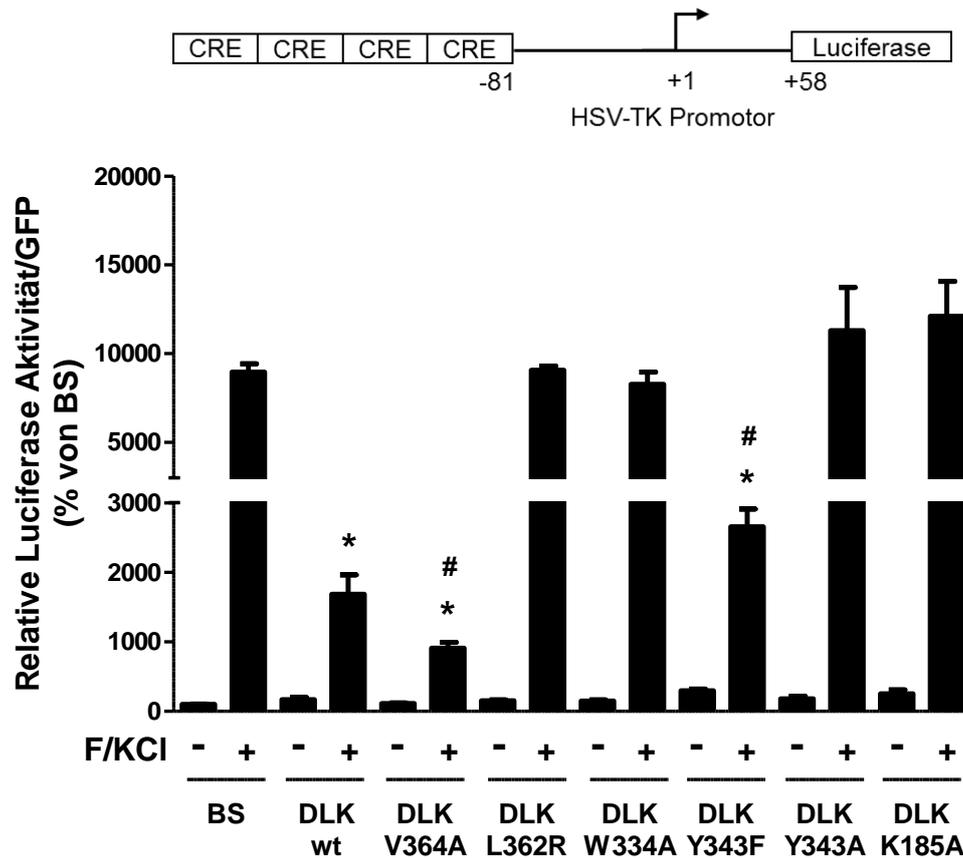


Abbildung 3.31: Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch DLK Mutanten der „Sandwich“-Struktur. HIT-T15 Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reporter gen unter der Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK) Genpromotors (- 81 bis + 58 bp) und vier Kopien des CRE Ratten-Somatostatinpromotors transfiziert (oben, schematische Darstellung). Die Expressionsvektoren für den Leervektor (Bluescript = BS), DLK wt, DLK V364A, DLK L362R, DLK W334A, DLK Y343F, DLK Y343A und DLK K185A wurden kotransfiziert. Die Zellen wurden 6 h vor der Ernte mit 40 mM KCl zur Membrandepolarisation und 10 μ M Forskolin (Aktivator der Adenylylcyclase) behandelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM der drei unabhängigen Experimente (jeweils in Doppelbestimmung) und sind relativ zu den Mittelwerten von Bluescript unstimuliert in jedem Experiment. * $p < 0,05$ vs. BS stimuliert (BS, „+“); # $p < 0,05$ vs. DLK wt stimuliert; t-Test.

3.2.4 Zusammenfassung

Die Mutation des Val-364 der putativen LxVP (LPVP) Calcineurin-Interaktionsdomäne innerhalb der DLK bewirkte den Verlust der Interaktion zwischen DLK und Calcineurin. Diese DLK V364A Mutante führte zu einer stärkeren Phosphorylierung der untergeordneten Kinase JNK und zu einer stärkeren Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription als der DLK wt. Des Weiteren war diese Mutante vermehrt im Kern lokalisiert und zeigte eine verstärkte apoptoseinduzierende Wirkung. Die calcineurinbindungsdefiziente Mutante ließ sich durch die spezifischen Calcineurininhibitoren Ciclosporin und Tacrolimus in Bezug auf nukleäre Lokalisation, β -Zellapoptose, CRE-abhängige Gentranskription und c-Jun-Phosphorylierung nicht beeinflussen.

Der Verlust der Kinaseaktivität durch Mutation des Leu-362 zu Ala innerhalb der DLK könnte in den fehlenden Wechselwirkungen mit ihren umgebenden Aminosäuren begründet sein.

3.3 Charakterisierung von β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-})

3.3.1 Phänotypische Unterschiede

Bezüglich Fertilität und Körpergewicht waren keine phänotypischen Unterschiede zwischen β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen feststellbar. Das Körpergewicht der männlichen Mäuse war sowohl in der β -DLK^{-/-}-Linie als auch in der DLK^{fl/fl}-Linie höher als das der weiblichen Mäuse (Abbildung 3.32).

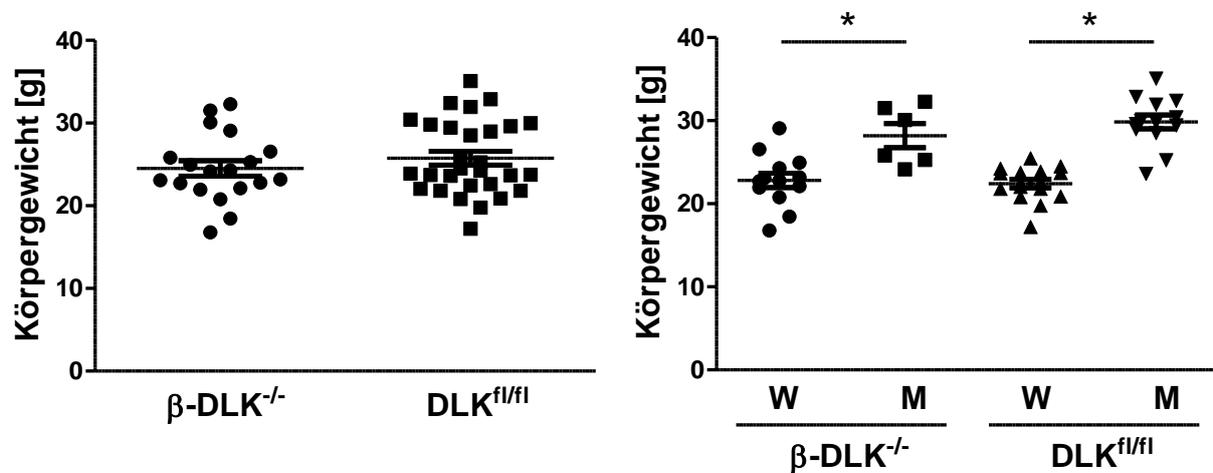


Abbildung 3.32: Keine Unterschiede im Körpergewicht von 14 - 15 alten β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. Die Mäuse wurden jeweils vor der Inseln-Isolation gewogen. W = Weibchen, M = Männchen; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM ausgedrückt. * $p < 0,05$; t-Test.

3.3.2 Abwesenheit der DLK in den primären Langerhans'schen Inseln der β -DLK^{-/-} Mäuse

Um die Abwesenheit der DLK in den β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen nachzuweisen, wurden die Pankreata 20 - 25 Wochen alter Mäuse entnommen und Paraffin- sowie Gefrierschnitte angefertigt. Abbildung 3.33 (A) zeigt, dass ein Antikörper gegen Insulin in beiden Mauslinien die Langerhans'schen Inseln anfärbte. In den DLK^{fl/fl} Geschwistertieren, jedoch nicht in den β -DLK^{-/-}, wurden die Inseln mit einem Antikörper gegen DLK gefärbt. Abbildung 3.33 (B) zeigt, dass es ebenfalls möglich war die Langerhans'schen Inseln von DLK^{fl/fl} Mäusen an Gefrierschnitten mit einem Antikörper gegen DLK zu färben. Es konnte keine DLK-Färbung in den Inseln der β -DLK^{-/-} Mäuse festgestellt werden.

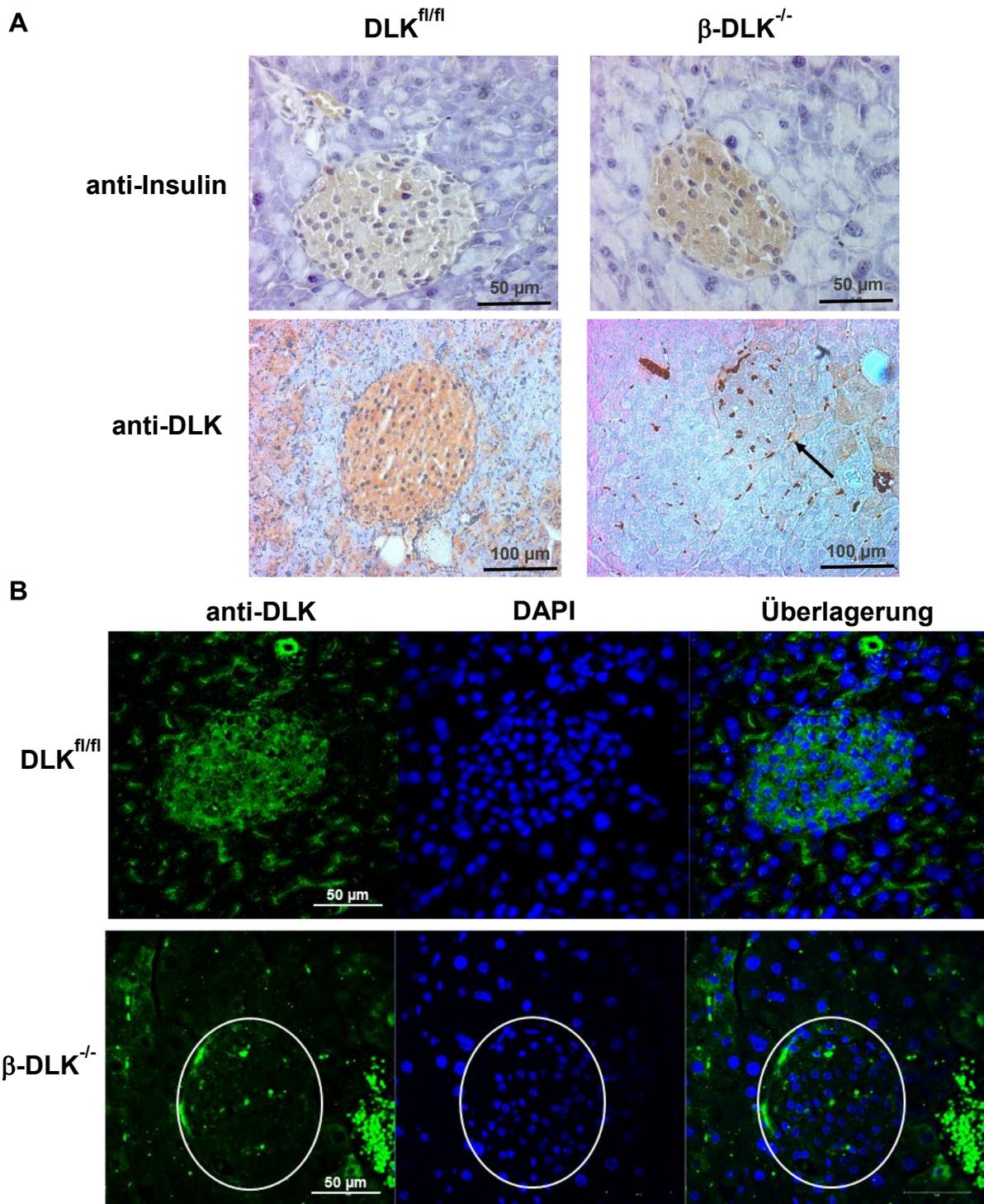


Abbildung 3.33: Abwesenheit der DLK in Langerhans'schen Inseln der β -DLK^{-/-} Mäusen. **A.** 3 μ m dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Pankreata der DLK^{fl/fl} (links) und β -DLK^{-/-} (rechts) Mäuse wurden mit Antikörpern gegen Insulin (1:50) (obere Reihe) oder gegen DLK (1:50) (untere Reihe) inkubiert und anschließend mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt; repräsentative Schnitte nach der Färbung. Der Pfeil zeigt eine DLK-negative Langerhans'sche Insel. **B.** Exemplarische Aufnahmen einer Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen DLK (1:50) auf 10 μ m dicke Pankreas-Kryoschnitte von DLK^{fl/fl} (obere Reihe) und β -DLK^{-/-} (untere Reihe) Mäusen. Linke Spalte, DLK-Färbung; mittlere Spalte, Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild. Die weißen Kreise zeigen eine DLK-negative Langerhans'sche Insel.

Die DLK-Proteinmenge wurde mittels Immunoblot in frisch isolierten Inseln von 14 - 15 Wochen alten β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen und ihren DLK geflochten Geschwistertieren untersucht. Die β -DLK^{-/-} Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte DLK-Expression verglichen mit ihren DLK^{fl/fl} Geschwistertieren (Abbildung 3.34). Dies könnte entweder darauf hinweisen, dass die Rekombination durch die Cre-Rekombinase nicht vollständig war oder dass die DLK auch in anderen Zellen der Langerhans'schen Inseln exprimiert wurde.

Die Untersuchung isolierter Langerhans'scher Inseln mittels Immunfluoreszenz (IF) gab Aufschluss über die genaue Lokalisation der β -Zellen und über die mittels Immunoblot nachgewiesene schwache DLK-Expression. Hierfür wurden die frisch isolierten Inseln für 3 Tage auf Deckgläschen kultiviert (Abbildung 3.35). Die Inseln wurden anschließend entweder mit einem Antikörper gegen Insulin zur Lokalisation der β -Zellen, gegen Glucagon zur Lokalisation der α -Zellen oder gegen DLK gefärbt. Die isolierten Inseln der β -DLK^{-/-} Mäuse ließen sich mit einem Antikörper gegen DLK färben, zeigten jedoch eine unterschiedliche Lokalisation dieser DLK-Färbung verglichen mit den DLK^{fl/fl} Geschwistertieren (Abbildung 3.35, A). Die Färbung mit einem Antikörper gegen Insulin zeigte, dass die β -Zellen im Innern der Inseln lokalisiert sind (Abbildung 3.35, B). α -Zellen konnten durch die Färbung mit Glucagon überwiegend am äußeren Rande der Inseln lokalisiert werden (Abbildung 3.35, C). Eine Doppelfärbung mit DLK und Insulin schloss aus, dass die DLK-Expression in den β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen durch die insulinproduzierenden β -Zellen entsteht (Abbildung 3.36).

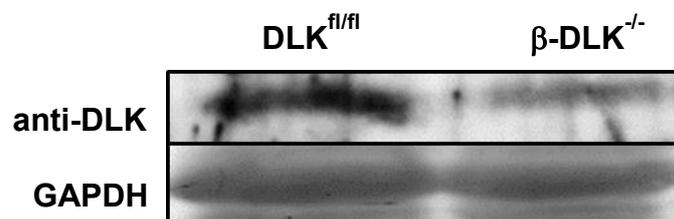


Abbildung 3.34: Schwache DLK-Protein-Expression in den isolierten Langerhans'schen Inseln der β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse. Proteinlysate aus 100 - 150 isolierten Inseln von 14 - 15 Wochen alten β -DLK^{-/-} Mäusen und ihren DLK^{fl/fl} Geschwistertieren wurden einer Immunoblotanalyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen DLK und gegen GAPDH als Ladekontrolle unterzogen. Typischer Immunoblot.

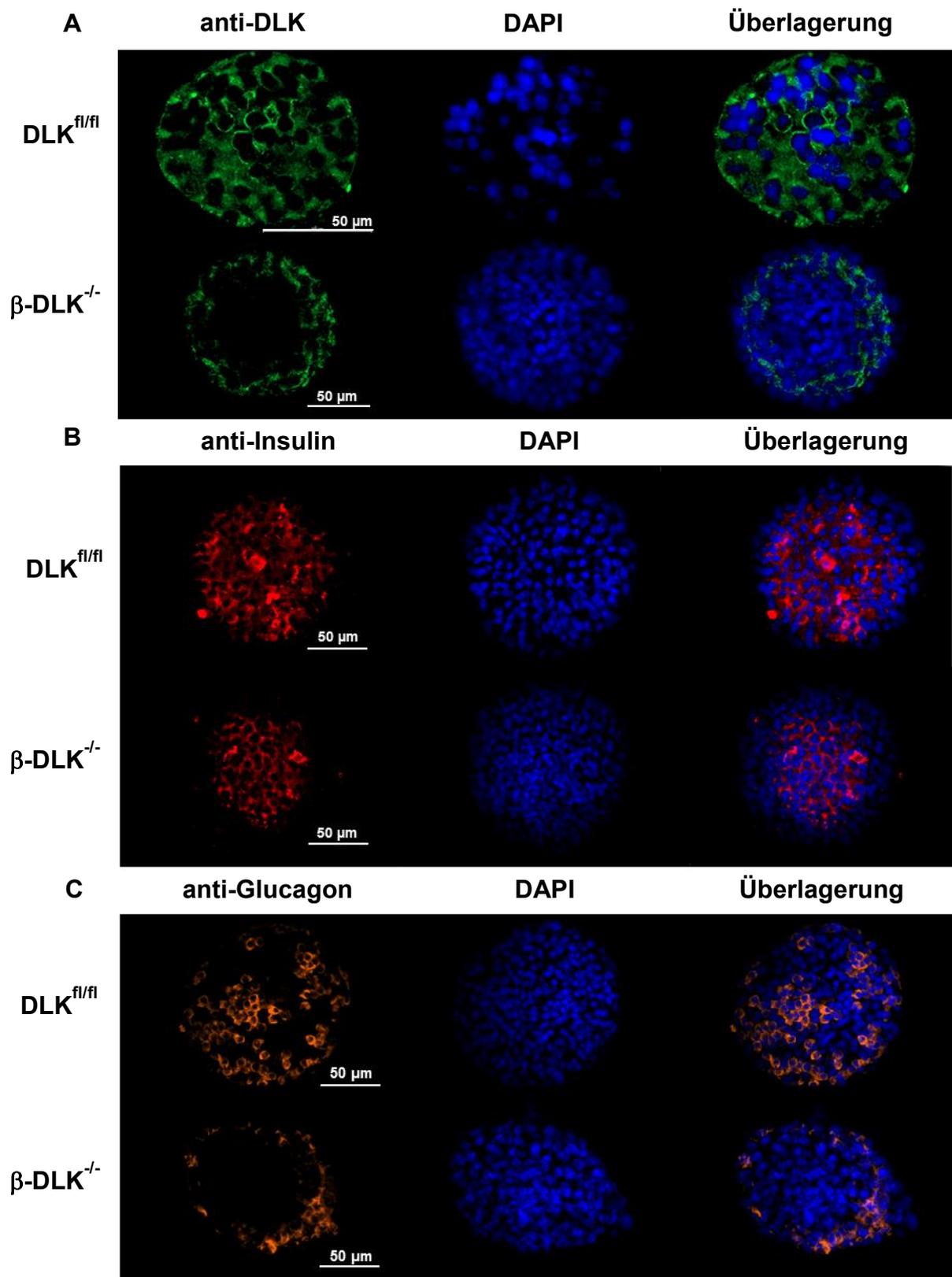


Abbildung 3.35: DLK-Expression und Lokalisation der α - und β -Zellen in Langerhans'schen Inseln von β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. A-C. Repräsentative Aufnahmen einer Immunfluoreszenz-Färbung Langerhans'scher Inseln mit den Antikörpern gegen DLK (1:50) (A), gegen Insulin (1:50) (B) und gegen Glucagon (1:200) (C). Linke Spalte, DLK-(A), Insulin-(B), Glucagon- (C); mittlere Spalte, Kernfärbung (DAPI); rechte Spalte, Überlagerungsbild.

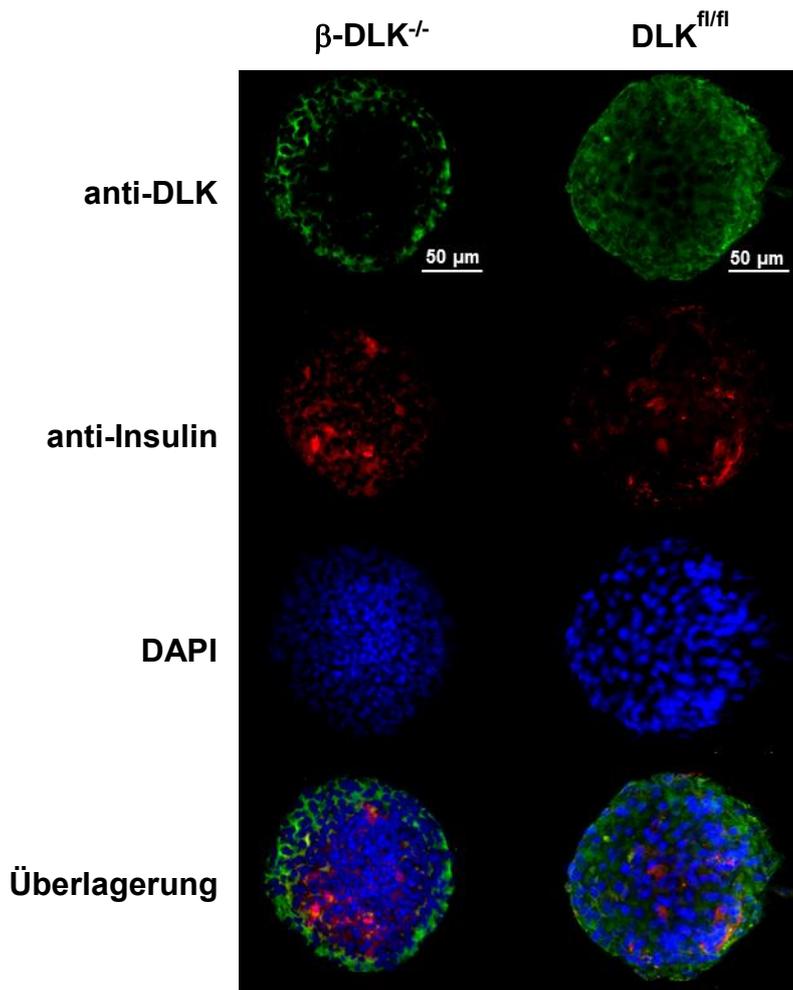


Abbildung 3.36: DLK-Proteinexpression in den α -Zellen der isolierten Langerhans'schen Inseln der β -DLK^{-/-} Mäuse. Repräsentative Aufnahmen einer Doppelfärbung von Langerhans'schen Inseln mittels Immunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen DLK (1:50) und gegen Insulin (1:50). Linke Spalte, β -DLK^{-/-}; rechte Spalte, DLK^{fl/fl}.

3.3.3 Anwesenheit der DLK in verschiedenen Gehirnregionen der β -DLK^{-/-} Mäuse

Die DLK wird im zentralen Nervensystem konstitutiv exprimiert. Das globale Ausschalten des DLK-Gens führt in Mäusen zum perinatalen Tod (Hirai et al., 2006; Itoh et al., 2011). Die β -zellspezifisch DLK defizienten Mäuse sterben dagegen nicht perinatal. Die Anwesenheit der DLK wurde in verschiedenen Gehirnbereichen immunhistologisch nachgewiesen. Im Cortex ließen sich Neurone sowie Gliazellen mit einem Antikörper gegen DLK färben. Die Neuronen des Gyrus dentatus (DG, *engl. dentate gyrus*) im Hippocampus und die Purkinje-Zellen sowie weitere Zellen der körnigen Schicht (Gl, *engl. granular layer*) im Cerebellum zeigten ebenfalls eine immunhistologische DLK-Färbung (Abbildung 3.37).

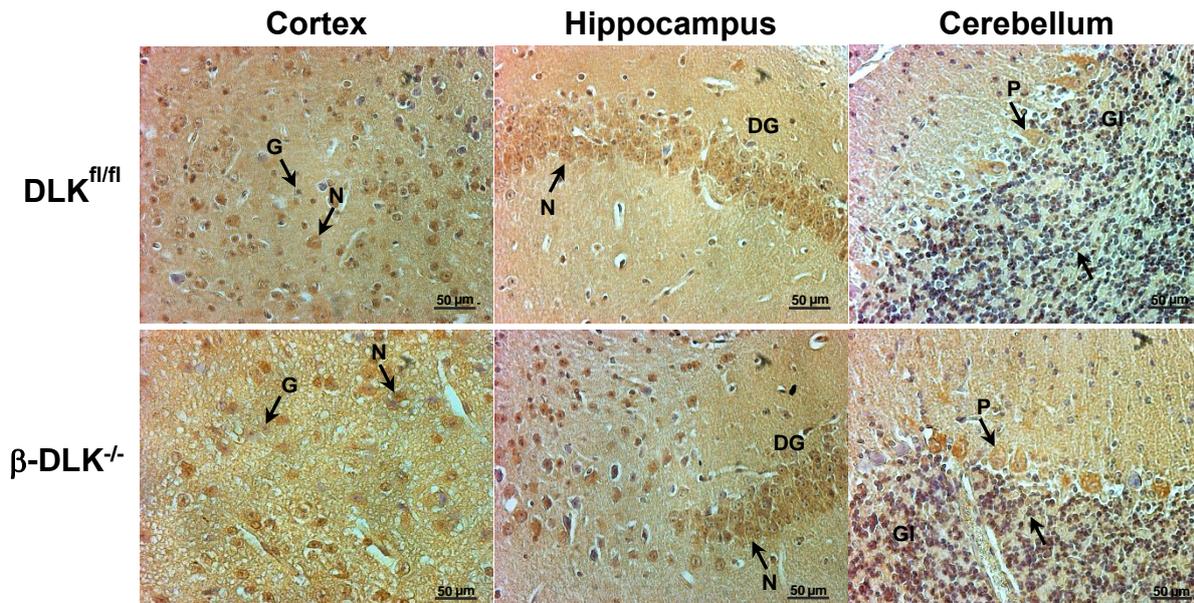


Abbildung 3.37: Anwesenheit der DLK in verschiedenen Gehirnregionen der β -DLK^{-/-} Mäuse. Repräsentative Aufnahmen einer DAB-Färbung des Gehirns mit einem Antikörper gegen DLK (1:50) auf 3 μ m dicke Paraffinschnitte von DLK^{fl/fl} (obere Reihe) und β -DLK^{-/-} (untere Reihe) Mäusen. Linke Spalte, Cortex; mittlere Spalte, Hippocampus; rechte Spalte, Cerebellum. DG = *dentate gyrus*; GI = *granular layer*. Die Pfeile im Bild zeigen die gefärbten Zellen: G = Gliazellen; N = Neuronen; P = Purkinje-Zellen.

3.3.4 Glukoseinduzierte Insulinsekretion

Um zu untersuchen, ob die β -DLK^{-/-} Mäuse eine normale Glukosetoleranz und letztlich eine normale physiologische Regulation der Glukosehomöostase entsprechend ihrer geflochtenen DLK^{fl/fl} Geschwistertiere besitzen, wurde in Kooperation mit Prof. Ingo Rustenbeck (TU, Braunschweig) die glukoseinduzierte Insulinsekretion aus frisch isolierten Langerhans'schen Inseln gemessen.

Die Inseln wurden von 0 min bis 60 min (Testperiode) substimulatorisch mit 5 mM Glukose perfundiert. Dieser Vorlauf diente der Angleichung der Messwerte bis zum Beginn der Stimulation. Eine Perfusion mit 30 mM Glukose zum Zeitpunkt 61 min bis 104 min führte zu einer zweiphasigen Zunahme der Insulinsekretion in den Inseln beider Mauslinien (Abbildung 3.38, A).

Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den β -DLK^{-/-} und den DLK^{fl/fl} Mäusen festzustellen. Durch die starke Streuung der einzelnen Messwerte wurde die Insulinsekretionsdaten auf die prästimulatorische Insulinsekretion zum Zeitpunkt 60 min normiert und diese einzeln für jede Perfusion als 100% gesetzt. Somit ließ sich

der Anstieg der Perifusion mit 30 mM Glukose besser beobachten. Die prästimulatorische Insulinsekretionsrate beider Gruppen war zum Zeitpunkt 60 min nicht unterschiedlich (Abbildung 3.38, B).

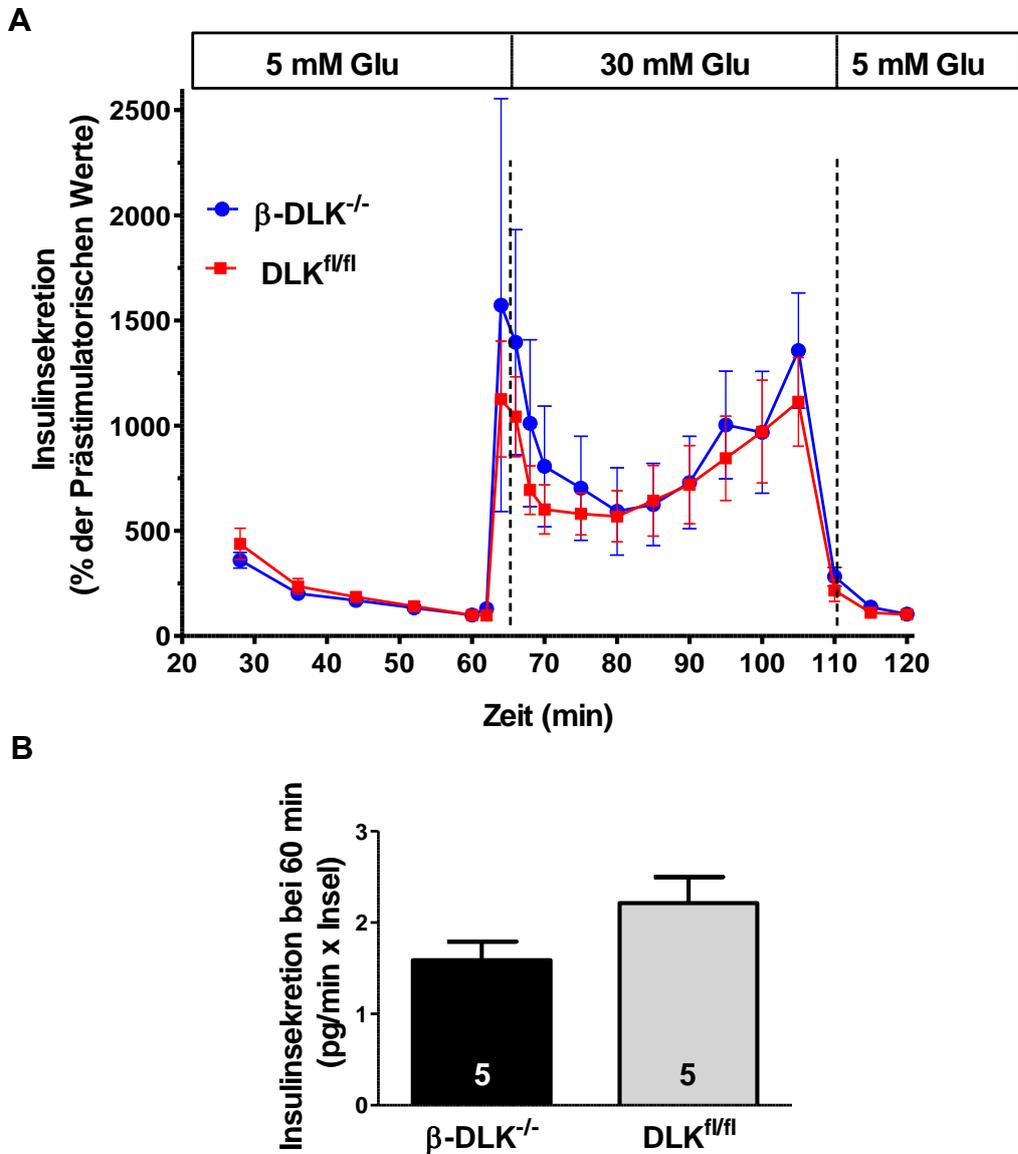


Abbildung 3.38: Glukoseinduzierte Insulinsekretion der isolierten Langerhans'schen Inseln von β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. **A.** Messung der glukoseinduzierten Insulinsekretionswerte aus perifundierten frisch isolierten Pankreasinseln von je fünf 15 - 18 Wochen alten DLK^{fl/fl} (rot) und β -DLK^{-/-} (blau) Mäusen. Die Inseln (50 Inseln/Maus) wurden prästimulatorisch mit 5 mM Glukose für 60 min perifundiert. Die Umstellung auf 30 mM Glukose vom Zeitpunkt 61 min bis 104 min induzierte die biphasige Insulinsekretion. Die Insulinsekretion wird als Prozentsatz der prästimulatorischen Insulinsekretion zum Zeitpunkt 60 min angegeben. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM der fünf Mäuse pro Genotyp für jeden gemessenen Zeitpunkt ausgedrückt. **B.** Prästimulatorische Insulinsekretion zum Zeitpunkt 60 min. Die Anzahl der Mäuse ist als Zahl in den Balken abgebildet. Glu = Glukose.

4 Diskussion

4.1 β -zellspezifisch DLK defiziente Mäuse (β -DLK^{-/-})

Die Dual Leucine-Zipper Kinase wurde 1994 von Holzmann, Merrit und Fan als „a *Serin/Threonin Kinase with two Leucine Zippers*“ identifiziert. Diese neuartige Proteinkinase wurde aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Primärstruktur zu der Familie der Mixed-Lineage-Kinasen gezählt. Das Fehlen der SH3-Domäne (*Src-homology 3 domain*) in der N-terminalen Region und der CRIB-Domäne (Cdc2/Rac-interaktive Bindung) innerhalb des C-Terminus stellten eine Besonderheit dieser Kinase innerhalb der MLKs dar. Als übergeordnete Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 12 (MAP3K12) kann die DLK untergeordnete Kinasen wie JNK und p38 über die Phosphorylierung von MKK4/7 aktivieren (Holzmann et al., 1994; Mata et al., 1996; Fan et al., 1996; Gallo und Johnson, 2002; Chang und Karin, 2001). Die DLK wird überwiegend im Gehirn sowie in mehreren Zelltypen einschließlich der pankreatischen Insulinproduzierenden β -Zelllinie HIT und der primären Langerhans'schen Inseln von Mäusen exprimiert (Holzmann et al., 1994; Hirai et al., 2006; Oetjen et al., 2006; Oetjen und Lemcke, 2016).

Aufgrund der überwiegenden Expression der Dual Leucine-Zipper Kinase in Neuronen und der Anreicherung an den synaptischen Enden geriet diese Kinase immer mehr in den Fokus der neuronalen Forschung. Diese Erkenntnisse führten zur näheren Untersuchungen des DLK-JNK Signalwegs. Ein *jnk1* und *jnk2* Doppel *Knockout* führte zu einer Beeinträchtigung der kortikalen Entwicklung im Gehirn von Mausembryonen und der Region-spezifischen Apoptose von undifferenzierten neuronalen Stammzellen. In verschiedenen Stufen der embryonalen Gehirnentwicklung bei Mäusen wurde ebenfalls eine Induktion der DLK-Expression sowie eine JNK-Aktivierung in unreifen Neuronen beobachtet (Kuan et al., 1999; Sabapathy et al., 1999; Hirai et al., 2002; Ghosh et al., 2011).

Des Weiteren führt das konstitutive Ausschalten dieser Kinase in Mäusen zu einer verminderten JNK-Aktivität, zu einer verminderten Phosphorylierung mehrerer JNK-Targets sowie zur unvollständigen Entwicklung von Axonen und Beeinträchtigungen in der Axonregeneration und in der neuronalen Migration. Diese

DISKUSSION

Mäuse sterben perinatal (Hirai et al., 2006; Itoh et al., 2011; Hammarlund et al., 2009; Tedeschi und Bradke, 2013).

Um die perinatale Letalität zu vermeiden und um die Rolle der DLK in den β -Zellen des Pankreas zu untersuchen, stehen grundsätzlich zwei Tiermodelle zur Verfügung: induzierbare globale transgene Tiere oder induzierbare und nicht-induzierbare β -zellspezifisch transgene Tiere (Abbildung 4.1).

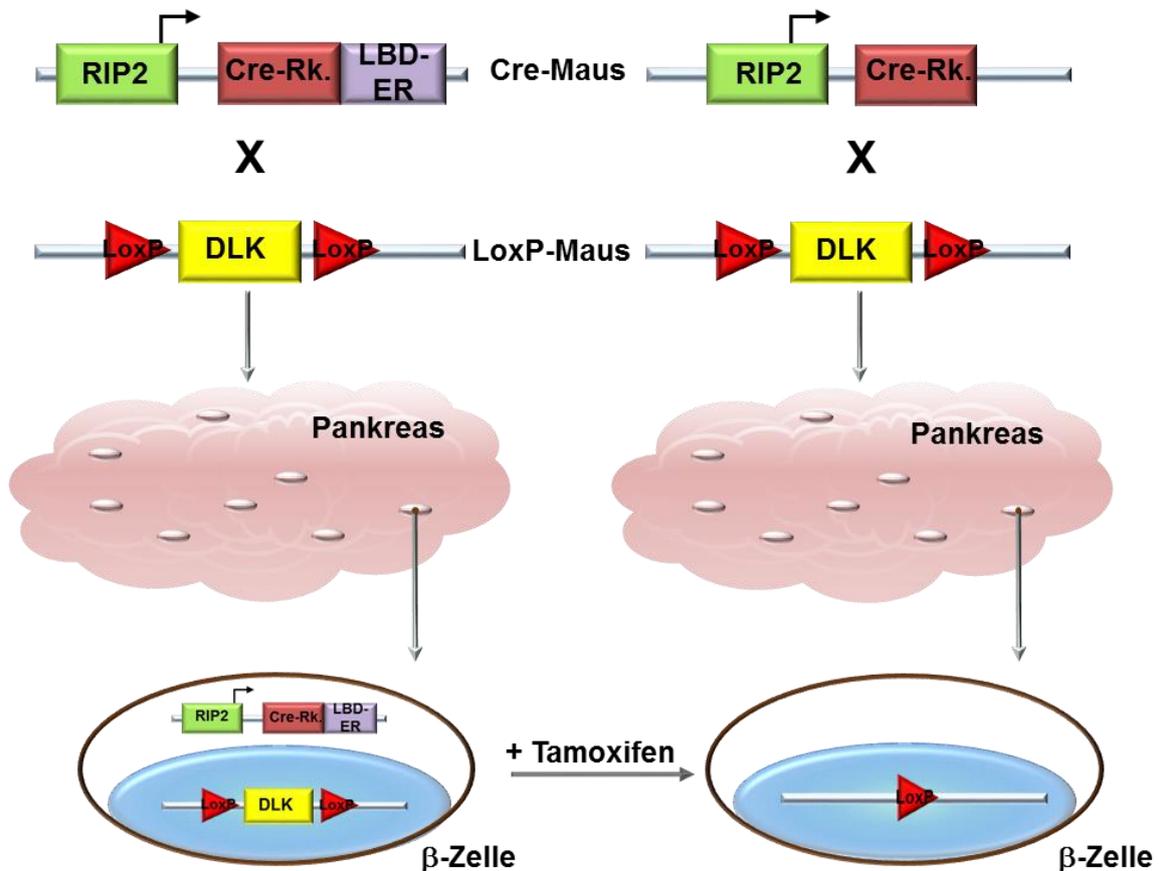


Abbildung 4.1: β -zellspezifische Tiermodelle. Links, induzierbare transgene Tiere (ein Beispiel): Die Cre-Rekombinase (Cre-Rk.) ist mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors (LBD-ER) am C-Terminus fusioniert. Durch die Modifikation dieser Domäne kann endogenes Estrogen nicht binden, jedoch synthetisches Tamoxifen. Die Expression dieses Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des Ratteninsulin-2-Promotors (RIP2). Nach der Verpaarung beider Mäuse liegt die fusionierte Cre-Rekombinase im Cytoplasma vor. Die Zugabe von Tamoxifen bzw. 4-Hydroxytamoxifen (aktiver Metabolit) bewirkt die nukleäre Translokation der Rekombinase. Im Zellkern bindet die Cre-Rekombinase an die LoxP-Stellen und der dazwischenliegende DNA-Bereich wird als zirkuläres Fragment ausgeschnitten. Rechts, nicht-induzierbare transgene Tiere: Die Rekombinase steht unter der Kontrolle des Ratteninsulin-2-Promotors. Nach der Verpaarung beider Mäuse wird die flankierte DNA geschnitten und das Gen ausgeschaltet. LoxP = Erkennungssequenz für die Rekombinase.

Die DLK-Funktion in erwachsenen Tieren wurde bereits mit einer induzierbaren globalen CRE-Rekombinase (Cre ERT) im Gehirn untersucht. Die DLK-Deletion an erwachsenen Mäusen zeigte keine Veränderungen bezüglich Körpergewicht oder verringerter Lebensfähigkeit. Die Gehirne dieser Mäuse zeigten eine normale Morphologie und Organisation von Neuronen im Cortex und Hippocampus (Pozniak et al., 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass DLK im Gehirn für die neuronale Entwicklung eine Rolle spielt, jedoch keine überlebenswichtige Aufgabe im Erwachsenenalter besitzt.

Andererseits stellt das konstitutive Ausschalten eines Gens kein geeignetes Modell für gewebespezifischen Untersuchungen dar. Daher sollte eine β -Zellspezifität im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt werden. Die Generierung dieser Mäuse ist dem Abschnitt 2.2.4 (Herstellung transgener Mäuse, Material und Methoden) zu entnehmen. Die β -Zellspezifität wurde durch die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des gut untersuchten und konstitutiv exprimierten Ratteninsulin-2-Promotors (CRE RIP, 706 bp) erzielt (Hanahan, 1985; Herrera et al., 1994; Herrera, 2000; Gesina et al., 2004; Hashimoto et al., 2006; Lee et al., 2006). Alle Nagetiere besitzen zwei unterschiedliche Insulingene, welche sich in der Nukleotidsequenz sowie in der Anzahl an Introns (1 bzw. 2) unterscheiden. Das Ratteninsulingen 2 zeichnete sich durch eine spezifischere Expression des Transgens aus (Hanahan, 1985; Herrera et al., 1994; Herrera, 2000). Im Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus wurden Ratteninsulin-Promotor-exprimierende Neuronen (RIP-Cre Neuronen) identifiziert, welche für die Nahrungsaufnahme bzw. Regelung des Appetits als auch des Energieaufwandes eine Rolle spielen (Lin et al., 2004; Choudhury et al., 2005; Hisadome et al., 2008; Kong et al., 2012). Eine nicht β -zellspezifische RIP-Cre Expression könnte dazu führen, dass diese Rekombinase im Gehirn bzw. im Hypothalamus exprimiert wird und dort das Gen ausschaltet (Gannon et al., 2000; Lee et al., 2006; Fex et al., 2007). Einige transgene RIP2-Cre Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Insulinsekretion und gestörte Glukosetoleranz (Lee et al., 2006). Die RIP-Cre Mäuse von Pedro Herrera zeigen im Gegensatz zu anderen Insulinpromotor-Cre-Rekombinase Mauslinien (Lee et al., 2006) keine Expression der Rekombinase im Hypothalamus sowie in anderen Geweben (Hashimoto et al., 2006).

Die Abwesenheit der DLK in den β -Zellen der von uns generierten transgenen Mäuse könnte jedoch dazu führen, dass die β -Zellen sich aus ihren endokrinen

Vorläuferzellen nicht oder nicht ausreichend ausdifferenzieren oder die für die β -Zelldifferenzierung und -funktion benötigten Transkriptionsfaktoren (Pax4; Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2, MafB) ihre Aufgaben nicht entfalten (Oliver-Krasinski und Stoffers, 2008; Afelik und Rovira, 2017). Der β -zellspezifische Transkriptionsfaktor MafA spielt eine besondere Rolle für die β -Zellfunktion. DLK vermindert die transkriptionelle MafA-Aktivität, die MafA-abhängige Gentranskription und reduziert den MafA-Proteingehalt. Die Degradation des MafA-Transkriptionsfaktors wird durch die DLK über die nachgeschaltete Kinase JNK, welche MafA am Ser-65 phosphoryliert, hervorgerufen (Stahnke et al., 2014). In Anbetracht dessen, dass das Ser-65 von MafA in MafB konserviert ist (Ser-70), könnte die DLK ebenfalls die MafB-abhängige Gentranskription hemmen und die transkriptionelle MafB-Aktivität vermindern. Der Verlust der MafA- und MafB-Aktivität könnte zur β -Zelldysfunktion in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beitragen (Guo et al., 2009; Guo et al., 2013; Stahnke et al., 2014). Der Transkriptionsfaktor MafB wird in α - sowie in β -Zellen von humanen und murinen Langerhans'schen Inseln exprimiert und ist essentiell für die Insulin- und Glucagon-Gentranskription in der Entwicklung dieser endokrinen Zellen (Dai et al., 2012; Guo et al., 2013). In Mäusen spielt MafB für die Entwicklung der α - und β -Zellen eine besondere Rolle. Nach der Geburt scheinen jedoch die Unterdrückung von MafB und die Prädominanz von MafA für die Ausreifung der β -Zellen erforderlich zu sein (Nishimura et al., 2006).

Weiterhin könnten Eigenschaften und Funktionen der β -Zellen durch die DLK-Deletion beeinträchtigt oder aufgehoben werden. Hierbei wird diskutiert, ob β -Zellen nach einer Pankreasverletzung oder unter physiologischen Bedingungen sich selbst erneuern können und die Hauptquelle für neue β -Zellen während des Erwachsenenlebens darstellen (Dor et al., 2004). Ferner erlaubt die erzwungene Expression von Pdx1, MafA und Ngn3 die Differenzierung von Azinuszellen des exokrinen Pankreas in insulinproduzierenden Zellen (Zhou et al., 2008; Li et al., 2014; Mansouri, 2012; Afelik und Rovira, 2017). Ebenfalls können α -Zellen unter robusten Bedingungen, die zu einem massiven und schnellen Verlust an β -Zellen führen, beispielsweise die globale Ablation von β -Zellen, eine Pankreas-Kanal-Ligation sowie β -Zellverletzung, zu β -Zellen differenzieren (Thorel et al., 2010; Chung et al., 2010 a, b; Collombat und Mansouri, 2009; Courtney et al., 2011). Die ektopische Expression von Pax4

konvertiert Vorläufer Zellen in α -Zellen und anschließend in β -Zellen (Collombat et al., 2009).

Die in dieser Arbeit generierten, β -zellspezifisch DLK defizienten Mäusen (β -DLK^{-/-}) zeigten keine phänotypischen Unterschiede bezüglich Körpergewicht und Fertilität verglichen mit ihren geflochten (DLK^{fl/fl}) Geschwistertieren. Das Gewicht der männlichen Mäuse war in beiden Gruppen höher als das Gewicht der weiblichen Tiere. Um eine Aussage über die Fertilität der Mäuse zu treffen, wurden 10 Wochen alte Böcke mit je zwei 9 Wochen alten Weibchen verpaart und nach 13 Wochen die Anzahl der Mäuse pro Wurf errechnet. Als Positivkontrolle diente eine Verpaarung mit DLK^{fl/fl} Mäusen. Die Verpaarung zur Herstellung von β -DLK^{-/-} Mäusen (Heterozygot DLK-KO mit DLK^{fl/fl}) brachte dieselbe Anzahl an Mäusen pro Wurf hervor wie eine Verpaarung unter DLK^{fl/fl} Mäusen (β -DLK^{-/-}: $7,8 \pm 0,40\%$; DLK^{fl/fl}: $7,7 \pm 0,48\%$). Ferner konnten keine groben Unterschiede bezüglich Nahrungsaufnahme und Verhalten festgestellt werden. Eine exakte Messung dieser Parameter wurde jedoch nicht durchgeführt.

Die Generierung von globalen DLK defizienten Mäusen (DLK^{-/-}) wurde zur Verifizierung des verwendeten *Targeting*-Vektors und der funktionellen LoxP-Stellen eingesetzt. Die Cre-Rekombinase wurde bei diesen Tieren unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten Cytomegalo-Virus-Promotors (CRE GLOB) exprimiert. Diese DLK^{-/-} Mäuse starben perinatal im Einklang mit früheren Publikationen (Hirai et al., 2006; Bloom et al., 2007; Ghosh et al., 2011). Die Anzahl der geborenen Mäuse pro Wurf wurde während eines Zeitraums von 56 Wochen aufgezeichnet. Die DLK^{-/-} Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte Anzahl an Mäusen pro Wurf gegenüber den β -DLK^{-/-} Mäusen (β -DLK^{-/-}: $7,7 \pm 0,23\%$; DLK^{-/-}: $3,4 \pm 0,80\%$). Der genaue Todeszeitpunkt für dieser Mäuse wurde bisher nicht untersucht.

Da die DLK überwiegend im Gehirn exprimiert wird, wurden verschiedene Gehirnbereiche der DLK^{fl/fl} und β -DLK^{-/-} Mäuse immunhistologisch untersucht: Neurone und Gliazellen im Cortex; Neurone des Gyrus dentatus im Hippocampus; Purkinje-Zellen und weitere Zellen der körnigen Schicht im Cerebellum ließen sich mit einem Antikörper gegen DLK färben. Dabei waren keine Unterschiede zwischen beiden Mauslinien feststellbar (Mata et al., 1996; *The Human Protein Atlas*, MAP3K12). Die DLK wird in Gehirn der β -DLK^{-/-} Mäuse exprimiert. Die β -zellspezifische DLK-Deletion und die verwendete Cre-Rekombinase unter der Kontrolle von RIP2 haben somit keinen Einfluss auf die DLK Expression im Gehirn.

Die β -DLK^{-/-} Mäuse zeigten keine DLK-Expression in den mit Diaminobenzidin oder mittels Immunfluoreszenz gefärbten Langerhans'schen Inseln verglichen mit den DLK^{fl/fl} Geschwistertieren. Ein Antikörper gegen Insulin zeigte, dass Insulin in beiden Mauslinien synthetisiert wurde. Um die Abwesenheit der DLK in den β -Zellen zu verifizieren, wurden Langerhans'schen Inseln von 14 - 18 Wochen alten Mäusen isoliert. Ein Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen DLK zeigte eine deutlich reduzierte DLK-Expression in den β -DLK^{-/-} Mäusen verglichen mit ihren DLK^{fl/fl} Geschwistertieren.

Eine Immunfluoreszenzfärbung von isolierten Langerhans'schen Inseln wurde als spezifischere Methode zur Lokalisation der DLK angewendet. Dieses Experiment hat ergeben, dass die DLK-Expression in den β -DLK^{-/-} Mäusen nicht durch die insulinproduzierenden β -Zellen zustande kam. Die überwiegende Lokalisation der α -Zellen am Rande der Inseln suggeriert, dass die α -Zellen ebenfalls DLK exprimieren. Somit liefert diese Arbeit erstmalig den Hinweis, dass DLK in den α -Zellen von murinen Langerhans'schen Inseln exprimiert wird.

Anomalien hinsichtlich der Insulinsekretion aus den pankreatischen β -Zellen sowie der Insulinwirkung auf die empfindlichen Gewebe (Muskel, Leber, Fettgewebe) sowie eine erhöhte endogene Glukoseproduktion treten beim klinischen apparenten Bild des Diabetes Mellitus Typ 2 auf (Porte Jr, 1991; Pratley und Weyer, 2000).

Die glukoseinduzierte Insulinsekretion isolierter pankreatischer β -Zellen zeigt ein biphasisches Muster (Pratley und Weyer, 2000). Die erste Reaktion auf Glukose ist eine akute Antwort, die zwischen 1 - 10 min anhält, wodurch schnell verfügbare Insulin-Kompartimente ausgeschüttet werden (schnelle oder frühe Phase). Diese rasche Insulinsekretion ist gefolgt von einem Rückgang zu annähernd basalen Werten. Die zweite Phase der Insulinsekretion bei fortgesetzter Glukoseexposition der β -Zellen ist langsam und kann konstant dosisabhängig für mehrere Stunden innerhalb eines zu beobachtenden Zeitraum aufrechterhalten werden. Dem biphasischen Muster der stimulierten Insulinsekretion schließt sich eine Desensibilisierungsphase an. Diese ist durch eine anhaltende niedrige Insulinsekretion gekennzeichnet (Pratley und Weyer, 2000; Del Prato und Tiengo, 2001).

Die Ergebnisse dieser Experimente, welche in Kooperation mit Prof. Rustenbeck (TU, Braunschweig) an isolierten Langerhans'schen Inseln erhoben wurden, zeigten

keine Unterschiede in dem biphasischen Muster der glukoseinduzierten Insulinsekretion zwischen den β -DLK^{-/-} und DLK^{fl/fl} Mäusen. Diese Beobachtung erleichtert die zukünftige Interpretation der Daten, da trotz Abwesenheit der DLK die β -DLK^{-/-} Mäuse eine normale glukoseinduzierte Insulinsekretion aufweisen.

Die β -zellspezifische DLK-Deletion scheint keinen Einfluss auf die Ausbildung und Ausreifung der β -Zellen sowie auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion zu haben. Des Weiteren waren keine groben morphologischen Veränderungen der β -Zellen in diesen β -DLK^{-/-} Mäusen festzustellen. Das Gewicht und die Fertilität wiesen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Ferner suggerieren diese Erkenntnisse, dass keine RIP-Cre Expression im Gehirn bzw. im Hypothalamus stattgefunden hat. Die DLK-Expression in den β -Zellen ist nicht essentiell für das perinatale Überleben der Mäuse.

4.2 Regulation der DLK

4.2.1 Regulation der DLK durch Calcineurin

Bei der Regulation der DLK scheint die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin eine bedeutende Rolle zu spielen (Mata et al., 1996).

Der Posttransplantationsdiabetes (PTDM), der dem Diabetes mellitus Typ 2 ähnelt, ist eine der unerwünschten Wirkungen einer immunsuppressiven Therapie mit Ciclosporin (CsA) und Tacrolimus (FK506) (Fernandez et al., 1999; Montori et al., 2002; Reddy et al., 2015). Beide Immunsuppressiva zeigten eine Beeinträchtigung der Insulinsekretion und der Insulinwirkung in Patienten nach einer Lebertransplantation (Fernandez et al., 1999) und in Ratten (Carroll et al., 1991; Hirano et al., 1992; Broja, 2001). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welches der beiden Immunsuppressiva stärker den PTDM induziert. In einigen Studien zeigte CsA eine höhere Prävalenzrate als FK506 (Broja, 2009; Markell, 2004), in anderen war es umgekehrt (Scantlebury et al., 1991; Plosker und Foster, 2000) oder beide Stoffe zeigten dieselbe Prävalenzrate (Tanabe, 2003) an einem PTDM zu erkranken. Entwickeln Patienten einen PTDM nach einer FK506-Behandlung, sollte eine

Dosisreduktion oder eine Umstellung auf CsA in Betracht gezogen werden, um das Risiko zu minimieren (Emre et al., 2000; Kanzler et al., 1996).

Die Entstehung eines Posttransplantationsdiabetes durch die strukturell unterschiedlichen Immunsuppressiva wird mit der spezifischen Hemmung der Phosphatase Calcineurin in Zusammenhang gebracht (Ho et al., 1996). Mäuse, in denen β -zellspezifisch die regulatorische Calcineurin Untereinheit B1 ausgeschaltet wurde, weisen einen verminderten Insulingehalt in den β -Zellen und eine verminderte β -Zellmasse auf. Diese Mäuse erkrankten an einem altersabhängigen Diabetes mellitus (Heit et al., 2006). Des Weiteren konnte in primären murinen Langerhans'schen Inseln gezeigt werden, dass hohe Glukosemengen zu einer Erhöhung der Calcineurinaktivität führen (Oetjen et al., 2003a). Die durch cAMP, durch Membrandepolarisation und durch Glukose stimulierte Insulingentranskription wurde durch die Behandlung mit CsA und FK506 in einer β -Zelllinie und in primären murinen Langerhans'schen Inseln vermindert (Oetjen et al., 2003a, 2003b; Lawrence et al., 2001).

Hemmung von Calcineurin durch die Immunsuppressiva CsA und FK506 vermindert die CRE/CREB-abhängige Gentranskription (Krüger et al., 1997; Oetjen et al., 2005; Screatton et al., 2004). Transgene Mäuse, die eine dominant negative CREB Mutante überexprimieren, werden aufgrund einer verstärkten β -Zellapoptose diabetisch (Jhala et al., 2003). Ferner erhöhen Substanzen, die Calcineurin hemmen, beispielsweise CsA, FK506 oder Wasserstoffperoxid als reaktive Wasserstoffspezies die enzymatische Aktivität der DLK in der β -Zelllinie HIT (Plaumann et al., 2008; Kutschenko, med. Diss. Göttingen, 2007).

Die Phosphorylierung der DLK am Ser-302 - ein Maß für die Aktivierung der DLK (Börchers et al., in Revision) - und die Phosphorylierung von JNK an Thr-183 und Tyr-185 ließen sich mit dem proinflammatorischen Cytokin $TNF\alpha$ und mit den oben erwähnten Calcineurininhibitoren in HIT Zellen erhöhen (diese Arbeit).

Die Aktivierung der DLK hemmt die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription und die transkriptionelle Aktivität von CREB, CBP und CRT1 (Oetjen et al., 2006; Phu et al., 2011; Plaumann et al., 2008; Stahnke et al., 2014; Wallbach et al., 2016). Diese Befunde lassen vermuten, dass Calcineurin durch Dephosphorylierung von DLK deren Kinaseaktivität vermindert und auf diese Weise zur Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und -masse beiträgt.

Der Transkriptionsfaktor NFAT ist ein bekanntes Calcineurinsubstrat (Beals et al., 1997; Crabtree und Olson, 2002). Die Überexpression einer konstitutiv aktiven NFAT Mutante in den Langerhans'schen Inseln von Calcineurin defizienten Mäusen erhöhte die mRNA-Spiegel von Insulin und anderen für die β -Zelle wichtigen Genen (Heit et al., 2006).

NFAT besitzt zwei putative Calcineurin-Interaktionsdomänen: PxlIT und LxVP (Aramburu et al., 1999; Li et al., 2007; Martínez-Martínez et al., 2006; Roy und Cyert, 2009; Rodríguez et al., 2009). Beide Interaktionsdomänen sind in der DLK konserviert: 273-PNMLIT-278 und 362-LPVP-365 (diese Arbeit). Die funktionelle Bedeutung beider putativen Calcineurin-Interaktionsdomänen wurde in der β -Zelllinie HIT untersucht. Mutation innerhalb der ersten Calcineurin-Interaktionsdomäne PxlIT führte zum Verlust der enzymatischen DLK-Aktivität. Diese Mutante (CN1) zeigte keine Phosphorylierung am Ser-302 der DLK und keine Phosphorylierung der untergeordneten Kinase JNK. Weiterführende Analysen (Kooperationspartner Dr. Thomas Lemcke) und Inspektion der Röntgenkristallstruktur der DLK (Patel et al., 2015) lassen vermuten, dass durch die Lokalisation dieser ersten Calcineurin-Interaktionsdomäne innerhalb der katalytischen Region der DLK der Grund für den Verlust der Aktivität durch die Mutation erklären könnte.

Durch die Lokalisation auf einer Schleife außerhalb der katalytischen Domäne ist die zweite Calcineurin-Interaktionsdomäne begünstigt eine Interaktion mit Calcineurin einzugehen. Zwei Einzelmutationen dieser Domäne L362A und V364A wurden auf Funktionalität überprüft.

Die DLK V364A Mutante wurde in demselben Ausmaß wie DLK wt am Ser-302 phosphoryliert. Bezüglich der Aktivierung der untergeordneten Kinase JNK, zeigte diese Mutante eine 2,2-fache erhöhte Phosphorylierung dieser Kinase. Des Weiteren hemmte die DLK V364A Mutante die stimulierte CRE/CREB-abhängige Gentranskription stärker als der DLK wt.

Das Konsensusmotiv LPVP stellte tatsächlich eine Interaktionsdomäne für Calcineurin innerhalb der DLK dar. Eine Protein-Protein Interaktion mit rekombinant hergestellten Proteinen lieferte den Beweis, dass die Mutation der Aminosäure Val-364 zu Ala zur Aufhebung der Interaktion führte. Mittels eines Kompetition-Assays mit Oligopeptiden konnte diese Aussage verifiziert werden.

Die DLK V364A Mutante ist vermehrt im Zellkern lokalisiert. Dort führt sie zu einer erhöhten Induktion der β -Zellapoptose. Die nukleäre Translokation des DLK wt und die

erhöhte Induktion der β -Zellapoptose ließen sich durch $\text{TNF}\alpha$ im Einklang mit unseren zuletzt publizierten Daten erhöhen (Wallbach et al., 2016). Die Calcineurininhibitoren CsA, FK506 und Wasserstoffperoxid erhöhten ebenfalls die nukleäre Translokation und den apoptoseinduzierenden Effekt des DLK wt, zeigten jedoch keinen zusätzlichen Effekt auf die DLK V364A Mutante.

Die Ergebnisse dieser Experimente sprechen dafür, dass die überexprimierte aktive Mutante durch die Mutation des Val-364 innerhalb des LPVP Calcineurin-Interaktionsdomäne weder von $\text{TNF}\alpha$ noch durch die Calcineurininhibitoren beeinflusst werden kann.

Um weiterführend die Wirkung der Calcineurininhibitoren auf den Effekt der calcineurinbindungsdefizienten DLK Mutante zu untersuchen, wurden Luciferase-Reportergergen-Assays durchgeführt. In HIT Zellen führten die Calcineurininhibitoren in den mit DLK wt und DLK V364A transient transfizierten Zellen zu einer verstärkten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription. Da die endogene Aktivität der DLK in den HIT Zellen den Effekt der Calcineurininhibitoren verfälschen könnte, wurde das Experiment in der DLK-negativen Zelllinie JEG-3 durchgeführt.

Die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription in den mit DLK V364A transient transfizierten Zellen ließ sich durch die Behandlung mit CsA und FK506 verstärken, während die Hemmung in den mit DLK wt transient transfizierten Zellen unbeeinflusst blieb. Die verstärkte Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription bei der calcineurinbindungsdefizienten Mutante korrelierte mit dem Effekt der Immunsuppressiva auf die mit dem Leervektor transient transfizierten Zellen. Eine mögliche Erklärung für den zusätzlichen Effekt der Calcineurininhibitoren auf die calcineurinbindungsdefiziente Mutante, jedoch nicht auf den DLK wt, könnte eine Verdrängungsreaktion sein. DLK Val-364 innerhalb der LPVP Interaktionsdomäne stellt eine Calcineurinbindungstelle dar. Ist diese Stelle mutiert - Val-364 in Ala - kann Calcineurin nicht mehr mit der DLK interagieren. Die Interaktion des DLK wt mit Calcineurin konnte ebenfalls in dieser Arbeit durch die überschussige Menge eines Peptids, das für die LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne innerhalb der DLK kodiert, aufgehoben werden. Die modifizierten Peptide (V364A und *Scrambled*) zeigten diesen Effekt nicht. Unter Berücksichtigung der Annahme, dass in den JEG-Zellen die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Behandlung mit CsA und FK506 verstärkt wurde (Kontrolle), kam es durch die Überexpression des DLK wt zu einer Verdrängung der Calcineurininhibitoren aus der hydrophoben Bindungsstelle des

Calcineurin. Somit ließ sich ausschließlich nur der Effekt des DLK wt für die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription beobachten. Diese Verdrängungsreaktion könnte über einen Zwischenschritt ablaufen (Abbildung 4.2). Da die calcineurinbindungsdefiziente Mutante eine mutierte LxVP-Interaktionsdomäne besitzt und diese nicht mit Calcineurin interagieren kann, können CsA und FK506 die Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription verstärken. Dieser zusätzliche Effekt ist vermutlich von der DLK unabhängig.

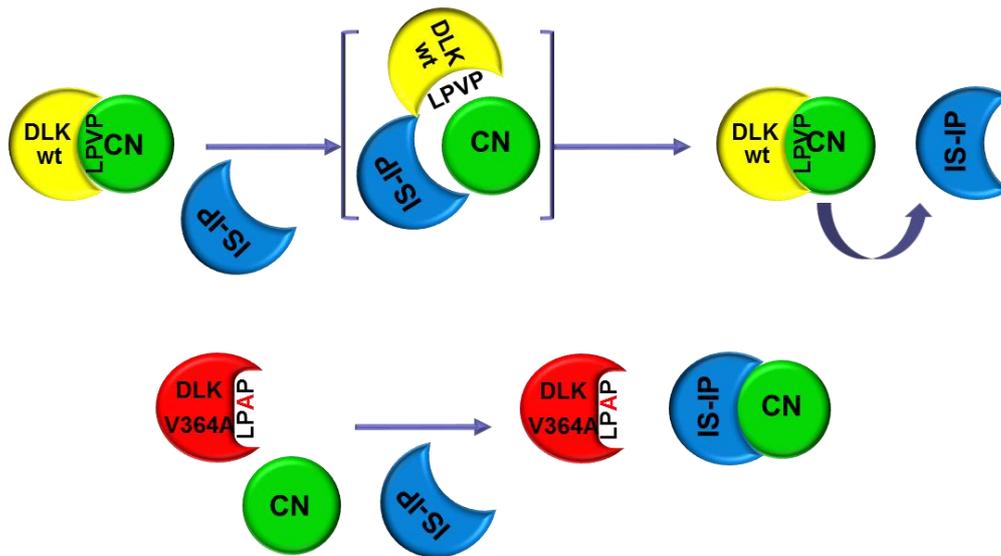


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Verdrängungsreaktion des überexprimierten DLK wt von Calcineurin durch die Immunsuppressiva CsA und FK506. Oben, der überexprimierte DLK wt - ein LxVP-Substrat - wird in den JEG-Zellen von Calcineurin dephosphoryliert. Diese Dephosphorylierung setzt vermutlich eine Interaktion des DLK wt über das LxVP-Motiv mit der hydrophoben Tasche des Calcineurin voraus. Die Behandlung mit den Immunsuppressiva (IS-IP, Immunsuppressiva-Immunophilin) führt zur Konkurrenz um die Bindungsstelle des Calcineurins. Der IS-IP Komplex verdrängt zunächst über einen Zwischenschritt den DLK wt aus der hydrophoben Tasche des Calcineurin, jedoch überwiegt der Effekt des überexprimierten DLK wt. Der beobachtete hemmende Effekt der CRE-abhängigen Gentranskription vor und nach der Behandlung ist gleich. Unten, die überexprimierte calcineurinbindungsdefiziente Mutante interagiert nicht mit Calcineurin. Die Behandlung mit dem IS-IP Komplex führt zur Hemmung des Calcineurin und verstärkt - vermutlich über DLK unabhängige Wege - die stimulierte CRE-abhängige Gentranskription.

Diese Erkenntnisse sind konsistent mit den Daten von Grigoriu et al., 2013. Die Immunsuppressiva CsA und FK506 mit ihren Immunophilinen binden jeweils an eine hydrophobe Tasche des Calcineurin zwischen den Untereinheiten A und B, welche ebenfalls eine LxVP-Substraterkennungsstelle darstellt. Es ist allerdings unbekannt, ob es sich dabei um dieselben Aminosäuren für die Bindung handelt (Abbildung 4.3).

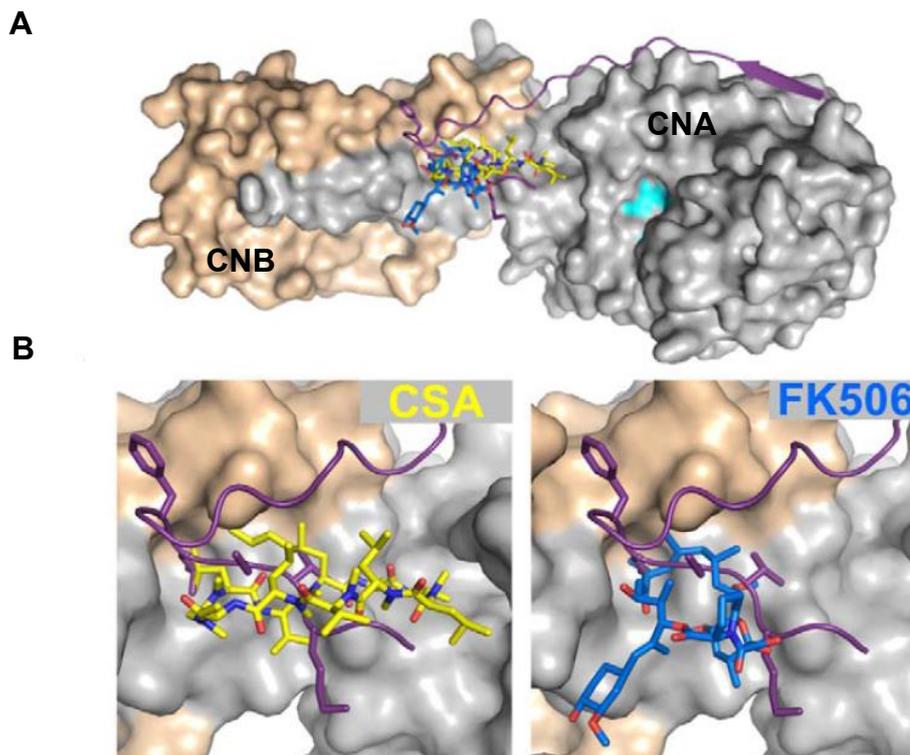


Abbildung 4.3: Kompetitive Hemmung von Calcineurin durch CsA, FK506 und LxVP-Substrate. Die immunsuppressiven Stoffe FK506 und CSA hemmen Calcineurin (CN) durch Besetzen der LxVP-Substraterkennungsstelle. **A.** Überlagerung von einem CN-gebundenen Peptid (lila), CsA (gelb) und FK506 (blau). **B.** Links, Überlagerung eines LxVP-Substrates mit CSA an der LxVP-Substratbindungsstelle. Rechts, Überlagerung eines LxVP-Substrates mit FK506. CNA = Calcineurin, katalytische Untereinheit A; CNB = Calcineurin, regulatorische Untereinheit B (Mod. Grigoriu et al., 2013).

Die Verdrängung eines LxVP-Substrates durch Ciclosporin und Tacrolimus aus dieser hydrophoben Tasche des Calcineurin könnte den Beitrag der Immunsuppressiva zur Entstehung eines PTDM erklären: endogene DLK wird in der Zelle durch Bindung an die LxVP-Substraterkennungsstelle der β -zellprotektiven Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert. Die immunsuppressiven Stoffe CsA und FK506 - in den jeweiligen Komplexen mit den Immunophilinen - verdrängen in der Zelle die endogene DLK aus der LxVP-Substraterkennungsstelle des Calcineurin. Die DLK kann durch Calcineurin nicht mehr dephosphoryliert werden und wird dadurch aktiv (Abbildung 4.4). Da die calcineurinbindungsdefiziente Mutante kein LxVP-Substrat darstellt, kann sie nicht von Calcineurin dephosphoryliert werden und führt per se zu einer verstärkten Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription.

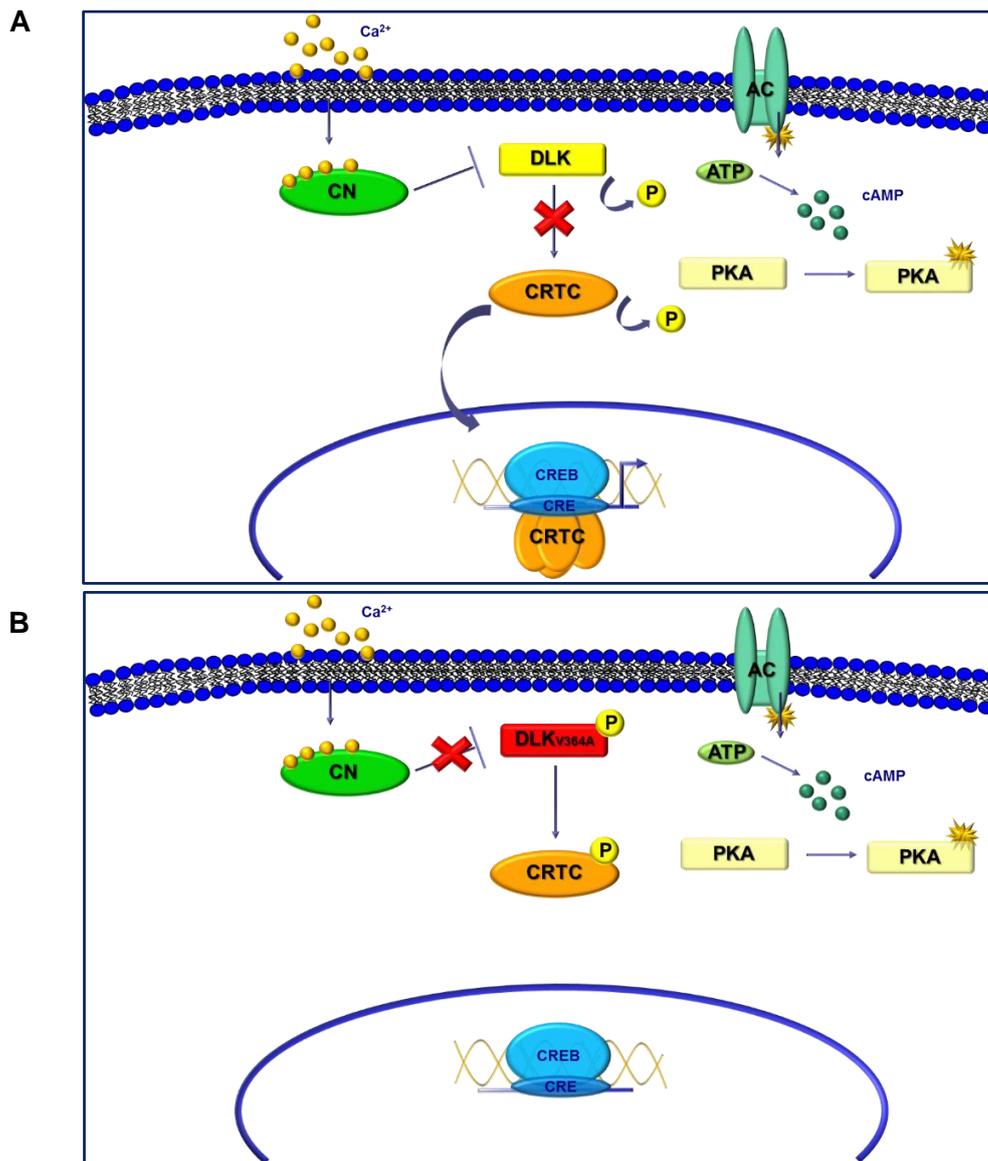


Abbildung 4.4: Stärkere Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die calcineurinbindungsdefiziente Mutante. Die Behandlung der Zellen mit KCl führt durch Membrandepolarisation zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Forskolin aktiviert die Adenylcyclase (AC), welche die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die ebenfalls die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen kann. Vier Ca^{2+} -Moleküle binden an die regulatorische Untereinheit B des Calcineurin (CN) und aktivieren die Phosphatase. **A.** DLK - ein LxVP-Substrat - wird durch die Interaktion an der LxVP-Substraterkennungsstelle des Calcineurin dephosphoryliert. Diese Kinase kann CRTC nicht mehr phosphorylieren. Dephosphoryliertes CRTC transloziert in den Nucleus und induziert die CRE/CREB-abhängige Gentranskription. **B.** Die calcineurinbindungsdefiziente Mutante kann über die LxVP-Substraterkennungsstelle des Calcineurin nicht mehr mit Calcineurin interagieren und wird nicht gehemmt. Die mutierte Kinase könnte CRTC in einem stärkeren Ausmaß phosphorylieren. Phosphoryliertes CRTC verbleibt im Cytoplasma. Es kommt zu einer verstärkten Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription. CRTC = cAMP regulated transcriptional coactivator.

Unter Berücksichtigung der hier erhobenen Daten könnte die zusätzliche Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription durch die Behandlung mit den Immunsuppressiva bei der calcineurinbindungsdefizienten Mutante über CRTC erklärt werden: CRTC kann unabhängig von der DLK durch Calcineurin dephosphoryliert werden. Da Calcineurin nicht mit der DLK V364A Mutante interagieren kann, führt eine Hemmung des Calcineurin durch die Immunsuppressiva zu einer stärkeren Phosphorylierung von CRTC. Dieser Effekt lässt sich mit einer verstärkten Hemmung der CRE-abhängigen Gentranskription beobachten.

Des Weiteren wurde die verstärkte Phosphorylierung von JNK durch die calcineurinbindungsdefiziente Mutante V364A bezüglich des JNK-Signalweges näher untersucht. Aktivierung von JNK führt zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun an Ser-63 und Ser-73 und trägt zur Neurodegeneration bei (Oetjen und Lemcke, 2016). Mäuse, die eine Mutation im c-Jun-Lokus (S63A, S73A) besitzen, zeigen einen verminderten apoptoseinduzierenden Effekt der Kainsäure im Hippocampus als Kontrollmäuse (Behrens et al., 1999). Die Deletion des gehirnspezifischen *jnk3* Gens schützt die hippocampalen Neuronen in Mäusen vor dem apoptoseinduzierenden Effekt der exzitatorischen Kainsäure (Dong et al., 1998; Yang et al., 1997, 1998). Ferner ist die Expression des an der Apoptose beteiligten c-fos vermindert, sobald der JNK-Signalweg gehemmt wird (Abdelli et al., 2007).

Die calcineurinbindungsdefiziente Mutante zeigte eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von c-Jun an Ser-73 als der DLK wt, wobei der Calcineurininhibitor CsA tendenziell keinen zusätzlichen Effekt brachte verglichen mit dem DLK wt.

Die c-fos-abhängige Gentranskription wurde durch DLK wt und DLK V364A in demselben Ausmaß aktiviert. Die aktuelle Arbeit von Huang et al., 2017 zeigt, dass die Aktivierung der DLK-Signalkaskade über die Aktivierung von untergeordneten Kinasen zur Phosphorylierung von c-Fos führt und somit zur Entstehung von Morbus Alzheimer beiträgt.

Die Calcineurininhibitoren CsA und FK506 besitzen ein erhöhtes neurotoxisches Potential (Land, 2004). So treten neurologisch/psychiatrische Komplikationen wie Kopfschmerzen, Tremor, Krampfanfälligkeit, Depressionen und Parästhesien an den Gliedmaßen häufiger unter der Behandlung mit den beiden Immunsuppressiva auf (Atakan und Erdem, 1998; Wijdicks et al., 1999; Gijtenbeek et al., 1999;

Idilman et al., 1998; Shapiro et al., 1990; Yocum et al., 2004; Plosker und Foster, 2000; Land, 2004).

Transgene Mäuse, die das menschliche β -Amyloid-Vorläuferprotein exprimieren und somit als ein Modell für Alzheimer-Krankheit dienen, zeigten eine verminderte Calcineurinaktivität in hippocampalen und kortikalen Neuronen sowie im Gehirn der erwachsenen Mäuse (España et al., 2010). Des Weiteren verursacht β -Amyloid eine Herunterregulierung von Calcineurin durch oxidativen Stress in Neuronen (Celsi et al., 2007). Unter Berücksichtigung dieser Daten lässt sich vermuten, dass die Hemmung von Calcineurin durch die Immunsuppressiva und die hier vermutete Verdrängung der DLK aus der LxVP-Substraterkennungsstelle von Calcineurin über eine Aktivierung der DLK an der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer beteiligt sein könnte.

Im Gegensatz zur Mutation an Val-364 führte die Mutation des Leu-362 in Ala innerhalb der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne der DLK zum Verlust der Kinaseaktivität. Dies führte zur näheren Inspektion der Röntgenkristallstruktur der DLK (Kooperationspartner Dr. Thomas Lemcke). Das Leu-362 schien Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Trp-334 und Tyr-343 einzugehen und einen Komplex in Form einer "Sandwich"-Struktur zu bilden. Durch Mutationen sollte verifiziert werden, ob diese Struktur zur Stabilität und Aktivität der Kinase beiträgt. Durch Mutation der Aminosäuren Trp-334 und Tyr-343 konnte gezeigt werden, dass der Verlust dieser "Sandwich"-Struktur mit einem Verlust der Kinaseaktivität einhergeht. Die Mutation von Trp-334 in Phe zeigte außerdem, dass Phenylalanin - eine dem Tryptophan ähnliche Aminosäure - die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die OH-Gruppe des Trp-334 keine Phosphorylierungsstelle für weitere Kinasen darstellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass DLK mit der Phosphatase Calcineurin über Val-364 innerhalb der LxVP Calcineurin-Interaktionsdomäne interagiert. Dies ist die gleiche Region, in der Calcineurin mit Ciclosporin und Tacrolimus zusammenwirkt, wodurch die Hemmung der Phosphatase-Aktivität unterbunden wird. Die Aufhebung der DLK-Calcineurin Interaktion erhöhte die Kinaseaktivität, induzierte die nukleäre Translokation der DLK und die β -Zellapoptose. Im Zusammenhang mit unseren bisherigen Daten deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Dephosphorylierung der DLK durch Calcineurin zu dem β -zellprotektiven Effekt der Phosphatase beiträgt.

Darüber hinaus wurde ein neuartiger Mechanismus zur Regulation der DLK-Aktivität nachgewiesen.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation der DLK

Adipositas gilt als der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2 (Kahn et al., 2014; Donath und Shoelson, 2011; Donath, 2016). In diesem Zustand wird das entzündungsfördernde Cytokin $\text{TNF}\alpha$ hauptsächlich in dem subakut entzündeten weißen Fettgewebe produziert, was eine chronische systemische subakute Entzündungsreaktion hervorruft. Hierbei könnte die Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe zu einer Erhöhung dieses proinflammatorischen Cytokins beitragen (Pickup und Crook, 1998). Neutralisierung von $\text{TNF}\alpha$ in fettleibigen und insulinresistenten Ratten verbesserte die Insulinrezeptor-abhängige Signaltransduktion und die Insulinsensitivität im peripheren Gewebe (Hotamisligil et al., 1993). Darüber hinaus wurde eine inhibitorische Form des Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) im Muskel- und Fettgewebe von Ratten beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass $\text{TNF}\alpha$ durch eine unerwartete inhibitorische Phosphorylierung des IRS-1 zu der Entwicklung der peripheren Insuliresistenz beiträgt (Hotamisligil et al., 1996). Ferner kann $\text{TNF}\alpha$ NF κ B und die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) aktivieren (Melloul, 2008; Brenner et al., 2015; Zeke et al., 2016). Die Aktivierung von JNK trägt zur Entstehung einer adipositasinduzierten Insulinresistenz und zu einer Verminderung der β -Zellmasse und -funktion bei (Vallerie und Hotamisligil, 2010; Stahnke et al., 2014; Zeke et al., 2016). Darüber hinaus führt die Langzeitbehandlung mit $\text{TNF}\alpha$ zu einer Verminderung der β -Zellfunktion und der Produktion von antiapoptotischen Proteinen (Zhang und Kim 1995; Parkash et al. 2005; Bouzakri et al. 2009). Neben $\text{TNF}\alpha$ spielt das proinflammatorische Cytokin IL-1 β in der Pathogenese des Diabetes eine besondere Rolle. IL-1 β hemmt den Transkriptionsfaktor MafA und die Insulingentranskription (Oetjen et al., 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-1 β während der hyperglykämischen Periode von β -Zellen produziert und sezerniert wird, was zum β -Zelltod beiträgt (Donath et al., 2003; Brooks-Worrell et al., 2012; Maedler et al., 2002). Der lösliche IL-1 β -Rezeptor Anakinra konnte in einer klinischen Studie den HbA1c-Wert von

Patienten reduzieren (Larsen et al., 2007). Dennoch wird der Beitrag von IL-1 β zur Pathogenese von Diabetes mellitus sehr kontrovers diskutiert. Bei hohen Glukosekonzentrationen konnte keine Induktion oder Aktivierung von IL-1 β in Ratten und humanen Inseln sowie keine Steigerung der IL-1 β -Konzentration in humanen Inseln von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden (Cnop et al., 2005; Welsh et al., 2005).

Diese proinflammatorischen Cytokine führen zu einer verstärkten Phosphorylierung von JNK (Brenner et al., 2015; Zeke et al., 2016), wobei nur TNF α DLK aktiviert (Börchers et al., in Revision). Während eine vorübergehende JNK-Aktivierung das Zellüberleben fördert, führt eine anhaltende JNK-Aktivierung - verursacht durch TNF α - zur Zellapoptose (Karin und Lin, 2002; Ventura et al., 2004; Wagner und Nebreda, 2009).

Diese Daten führten zu der Hypothese, dass das proinflammatorische Cytokin TNF α über die Aktivierung der DLK und anschließender Aktivierung von JNK seine apoptotischen Eigenschaften in den β -Zellen vermittelt. Im Rahmen seiner medizinischen Dissertation identifizierte Manuel Wallbach im Jahr 2010 (Arbeitsgruppe von Prof. Elke Oetjen) zwei funktionelle Kerner kennungssequenzen (NLS, *engl. nuclear localization sequence*) innerhalb der DLK. Durch Mutation der Kerner kennungssequenz verminderte sich sowohl die cytokininduzierte nukleäre Translokation der DLK als auch ihre hemmende Wirkung auf die β -zellprotektive CRE/CREB- und CBP-abhängige Gentranskription, jedoch ohne die untergeordnete Kinase JNK schwächer als DLK Wildtyp zu phosphorylieren. Dies lässt vermuten, dass die nukleäre Translokation der DLK für den cytokininduzierten β -zellapoptotischen Effekt verantwortlich sein könnte, sodass die Lokalisation der DLK im Zellkern zu einer verstärkten Apoptoseinduktion führt und durch die Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription zum Verlust der β -Zellmasse und -funktion beiträgt.

In dieser Arbeit konnte ein Nukleäres Exportsignal (NES) mit 481-LQLEL-485 als Konsensusmotiv innerhalb der DLK identifiziert werden (La Cour et al., 2004). Mutation der Leucine 481, 483 und 485 innerhalb des NES-Konsensusmotivs führte nach transienter Transfektion des Expressionsvektors in HIT Zellen zu keiner Veränderung in der Phosphorylierung von JNK oder in der durch Membrandepolarisation induzierten

CRE-abhängigen Gentranskription verglichen mit dem DLK Wildtyp. Der hemmende Effekt auf die CRE-abhängige Gentranskription konnte durch Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ gesteigert werden. Das ist konsistent mit der Annahme, dass $\text{TNF}\alpha$ die Translokation der DLK in den Nukleus verstärkt und dort die CRE-abhängige Gentranskription stärker inhibiert.

Die nukleäre Lokalisation und der apoptoseinduzierende Effekt der DLK konnte durch die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ gesteigert werden. Hierbei zeigte die DLK NES Mutante durch einen längeren Aufenthalt im Kern eine stärkere Induktion der β -Zellapoptose, verglichen mit DLK Wildtyp.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die nukleäre Lokalisation der DLK wichtig für die cytokinvermittelte Induktion der β -Zellapoptose ist. Die β -zelltoxischen Effekte der prädiabetischen Signale können über eine verbesserte nukleäre Lokalisation von DLK, welche zur Hemmung der CRE/CREB-abhängigen Gentranskription führt, β -Zellapoptose induzieren und durch eine erhöhte Phosphorylierung und Aktivierung von JNK, welche die MafA-Transkriptionsaktivität inhibiert, die β -Zellfunktion vermindern.

Diese von uns bereits publizierten Daten (Wallbach et al., 2016) zeigen, dass sowohl die enzymatische Aktivität der DLK als auch ihre subzelluläre Lokalisation die Wirkung dieser Kinase bestimmen. Unter basalen Bedingungen befindet sich DLK hauptsächlich im Cytosol und zeigt eine stimulusinduzierte nukleäre Translokation. Durch Mutation der Kernerkenntnissequenz der DLK verbleibt diese Kinase trotz Stimulus im Cytosol und induziert keine Hemmung der CREB-abhängigen Gentranskription, jedoch war sie in der Lage JNK in demselben Ausmaß wie DLK wt zu phosphorylieren. Die Mutation des nukleären Exportsignals führt nach einer stimulusinduzierten nukleären Translokation zu einem längeren Verbleib dieser Kinase im Kern, was zu einer Erhöhung des apoptoseinduzierenden Effektes dieser Kinase in β -Zellen führt. Die negativen Effekte der DLK auf die β -Zellen kann zumindest teilweise durch die Lokalisation dieser Kinase im Kern hervorgerufen werden.

Diese Daten sind konsistent mit den Ergebnissen der calcineurinbindungsdefizienten Mutante. DLK V364A war überwiegend im Kern lokalisiert und zeigte eine verstärkte β -Zellapoptoseinduzierende Wirkung.

5 Zusammenfassung

Die Dekompensation der β -Zelle mit Dysfunktion und Verlust der Masse führt zum klinisch apparenten Bild des Diabetes mellitus Typ 2. Bisherige Daten zeigen, dass die strukturell unterschiedlichen Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin durch Hemmung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin die Insulingentranskription vermindern und β -Zellapoptose induzieren. Zusätzlich verstärken beide Arzneimittel die Aktivität der Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 12 (DLK, *dual leucine zipper kinase*). Des Weiteren hemmt DLK die transkriptionelle Aktivität des β -zellprotektiven Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*). Angesichts der Bedeutung von CREB für die Aufrechterhaltung der β -Zellfunktion und -masse könnte dieser Mechanismus zu der DLK induzierten β -Zellapoptose beitragen. In dieser Arbeit wurde die Regulation der DLK durch Calcineurin untersucht.

Mittels *in silico* Analysen wurden zwei putative Calcineurin-Interaktionsdomänen innerhalb der DLK identifiziert. Mutation von Val-364 zu Ala innerhalb der zweiten Calcineurin-Interaktionsdomäne erhöhte die Phosphorylierung der untergeordneten c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und hemmte die KCl/Forskolin-induzierte CRE/CREB-abhängige Gentranskription in einem stärkeren Ausmaß als DLK Wildtyp. In HIT Zellen, die mit der DLK V364A Mutante transfiziert wurden, konnte eine Zunahme der nukleären Translokation und β -Zellapoptose im Vergleich zu den mit DLK Wildtyp transfizierten Zellen beobachtet werden. Der Tumornekrosefaktor (TNF) α und die Calcineurininhibitoren Ciclosporin, Tacrolimus und Wasserstoffperoxid (ROS) erhöhten die nukleäre Translokation und die Apoptose in den mit DLK Wildtyp transient transfizierten Zellen, während bei den mit DLK V364A transient transfizierten Zellen die nukleäre Translokation und die Apoptose nicht verstärkt werden konnten.

Ein Protein-Protein Interaktionsassay mit rekombinant hergestellten DLK und Calcineurin zeigte, dass diese Mutation die Interaktion zwischen Calcineurin und DLK verhinderte.

In Anbetracht dessen, dass LxVP eine Calcineurin-Interaktionsdomäne innerhalb der DLK darstellt, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Interaktion von DLK mit Calcineurin über das LPVP-Motiv zu einer Dephosphorylierung und Hemmung der DLK-Aktivität führt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von DLK in β -Zellen durch prädiabetische Signale zu untersuchen. $\text{TNF}\alpha$ induzierte die nukleäre Translokation von DLK Wildtyp. In der vorliegenden Arbeit wurde ein funktionelles nukleares Exportsignal (NES, *nuclear export signal*) innerhalb der DLK identifiziert. Mutation des NES zeigte einen längeren Aufenthalt von DLK im Zellkern und erhöhte somit die Apoptose. Diese Daten zeigen, dass DLK je nach subzellulärer Lokalisation unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausübt und somit eine neuartige Regulation der DLK-Aktivität bieten.

Für weiterführende Untersuchungen wurden Mäuse generiert, in denen spezifisch in den β -Zellen DLK ausgeschaltet wurde. Diese Mäuse zeigen keine groben phänotypischen Auffälligkeiten und eine normale glukoseinduzierte Insulinsekretion. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass eine β -zellspezifische Hemmung der DLK den β -zellschädigenden Effekt dieser Kinase auf β -Zellmasse und -funktion verhindern und dazu beitragen könnte, die Entwicklung und das Fortschreiten des Diabetes mellitus Typ 2 zu vermeiden.

6 Abstract

Decrease in β -cell mass and function are the most important factors for the clinical manifestation of type 2 diabetes mellitus. Previous data show that the structurally distinct immunosuppressive drugs tacrolimus and cyclosporin A decrease insulin gene transcription and induce β -cell apoptosis by inhibiting the calcium-calmodulin dependent phosphatase calcineurin. In addition, both drugs enhance the activity of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12 (DLK, dual leucine zipper kinase). Furthermore, DLK induces β -cell apoptosis by inhibiting the transcriptional activity conferred by the β -cell protective transcription factor cAMP response element binding protein CREB. This mechanism might contribute to β -cell loss. In this thesis, the regulation of DLK by calcineurin was investigated.

In silico analysis revealed two putative calcineurin interaction domains within the DLK. Mutation of Val-364 to Ala within the second putative calcineurin interaction domain increased the phosphorylation of the downstream c-Jun N-terminal kinase (JNK) and was more potent to inhibit KCl/Forskolin-induced CRE/CREB dependent gene transcription than DLK wild-type. In HIT cells transfected with the DLK V364A mutant an increase in β -cell apoptosis and nuclear translocation compared to cells transfected with DLK wild-type was observed. The tumor necrosis factor (TNF) α and the calcineurin inhibitors cyclosporin A, tacrolimus, and hydrogen peroxide (ROS) increased apoptosis and nuclear translocation in DLK wild-type transfected cells, whereas in DLK V364A mutant transfected cells apoptosis and nuclear translocation could not be further stimulated.

Consistent with the notion that calcineurin inhibits DLK activity a protein protein interaction assay with recombinantly produced DLK and calcineurin showed that DLK wild-type but not the DLK V364A mutant interacted with calcineurin.

Considering that LxVP represents a calcineurin interaction domain, these results suggest that the interaction of DLK with calcineurin via its LPVP motif dephosphorylates and inhibits DLK activity.

Another aim of this thesis was to investigate the regulation of DLK in β -cells by prediabetic signals. TNF α induced the nuclear translocation of DLK wild-type. In this thesis a functional nuclear export signal (NES) within DLK was additionally identified. Mutation of the NES lead to an extended stay of DLK in the nucleus and thereby

ABSTRACT

increased apoptosis. These data demonstrate that DLK exerts distinct functions, depending on its subcellular localization and thus provide a novel level of regulating DLK action.

For further investigations, mice were generated in which DLK was specifically deleted in the β -cells. These mice do not show rough phenotypic abnormalities and a normal glucose-induced insulin secretion.

Taken together, this thesis suggests that a specific DLK inhibition can prevent the β -cell damaging kinase effect on β -cell mass and function and could contribute to avoid the development and progression of type 2 diabetes mellitus.

7 Literaturverzeichnis

- Abdelli, S., Papas, K. K., Mueller, K. R., Murtaugh, M. P., Hering, B. J., & Bonny, C. (2014). Regulation of the JNK3 signaling pathway during islet isolation: JNK3 and c-fos as new markers of islet quality for transplantation. *PLoS one*, 9(7), e99796.
- Afelik, S., & Rovira, M. (2017). Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors?. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 445, 85-94.
- Aitken, A., Klee, C. B., & Cohen, P. (1984). The structure of the B subunit of calcineurin. *European journal of biochemistry*, 139(3), 663-671.
- Altarejos, J. Y., & Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(3), 141-151.
- American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 27(suppl 1), s5-s10.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- Ammendrup, A., Maillard, A., Nielsen, K., Andersen, N. A., Serup, P., Madsen, O. D., ... & Bonny, C. (2000). The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 49(9), 1468-1476.
- Aramburu, J., Yaffe, M. B., López-Rodríguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., & Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*, 285(5436), 2129-2133.
- Atakan, N., & Erdem, C. (1998). The efficacy, tolerability and safety of a new oral formulation of Sandimmun®-Sandimmun Neoral® in severe refractory atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 11(3), 240-246.
- Babaeikeshomi, R. (2013). Regulation of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) by Prediabetic Signals.
- Beals, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N., & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes & Development*, 11(7), 824-834.
- Beck-Nielsen, H. (2002). Insulin resistance: organ manifestations and cellular mechanisms. *Ugeskrift for læger*, 164(16), 2130-2135.
- Behrens, A., Sibilio, M., & Wagner, E. F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature genetics*, 21(3), 326-329.
- Benitez, C. M., Goodyer, W. R., & Kim, S. K. (2012). Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6), a012401.
- Bisson, N., Tremblay, M., Robinson, F., Kaplan, D. R., Trusko, S. P., & Moss, T. (2008). Mice lacking both mixed-lineage kinase genes *Mlk1* and *Mlk2* retain a wild type phenotype. *Cell Cycle*, 7(7), 909-916.
- Bittinger, M. A., McWhinnie, E., Meltzer, J., Iourgenko, V., Latario, B., Liu, X., ... & Labow, M. (2004). Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. *Current Biology*, 14(23), 2156-2161.
- Bloom, A. J., Miller, B. R., Sanes, J. R., & DiAntonio, A. (2007). The requirement for *Phr1* in CNS axon tract formation reveals the corticostriatal boundary as a choice point for cortical axons. *Genes & development*, 21(20), 2593-2606.

- Bonny, C., Oberson, A., Steinmann, M., Schorderet, D. F., Nicod, P., & Waeber, G. (2000). IB1 reduces cytokine-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Journal of biological chemistry*, 275(22), 16466-16472.
- Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C., & Schorderet, D. F. (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK. *Diabetes*, 50(1), 77-82.
- Bouzakri, K., Ribaux, P., & Halban, P. A. (2009). Silencing mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) protects beta cells from tumor necrosis factor- α -induced decrease of IRS-2 and inhibition of glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 27892-27898.
- Börchers, S. (2014). Wirkung der proinflammatorischen Zytokine TNF-Alpha und IL-1Beta auf die CREB abhängige Gentranskription und das Zellüberleben in Abhängigkeit von der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase in einer Betazelllinie.
- Brooks-Worrell, B., Narla, R., & Palmer, J. P. (2012). Biomarkers and immune-modulating therapies for type 2 diabetes. *Trends in immunology*, 33(11), 546-553.
- Brancho, D., Ventura, J. J., Jaeschke, A., Doran, B., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2005). Role of MLK3 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular and cellular biology*, 25(9), 3670-3681.
- Brenner, D., Blaser, H., & Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 362-374.
- Broja, J. M. (2009). *Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie nach orthotoper Lebertransplantation* (Doctoral dissertation, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn).
- Cardenas, M. E., Zhu, D., & Heitman, J. (1995). Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 4(6), 472-477.
- Carroll, P. B., Boschero, A. C., Li, M. Y., Tzakis, A. G., Starzl, T. E., & Atwater, I. (1991). Effect of the immunosuppressant FK506 on glucose-induced insulin secretion from adult rat islets of Langerhans. *Transplantation*, 51(1), 275.
- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X., & Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *The EMBO Journal*, 14(23), 5957.
- Celsi, F., Svedberg, M., Unger, C., Cotman, C. W., Carri, M. T., Ottersen, O. P., ... & Torp, R. (2007). Beta-amyloid causes downregulation of calcineurin in neurons through induction of oxidative stress. *Neurobiology of disease*, 26(2), 342-352.
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Chen, X., Rzhetskaya, M., Kareva, T., Bland, R., Doring, M. J., Tank, A. W., ... & Burke, R. E. (2008). Antiapoptotic and trophic effects of dominant-negative forms of dual leucine zipper kinase in dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *Journal of Neuroscience*, 28(3), 672-680.
- Chou, J. Y. (1982). Effects of retinoic acid on differentiation of choriocarcinoma cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 54(6), 1174-1180.
- Choudhury, A. I., Heffron, H., Smith, M. A., Al-Qassab, H., Xu, A. W., Selman, C., ... & Bedford, D. C. (2005). The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and β cell function. *The Journal of clinical investigation*, 115(4), 940-950.
- Chung, C. H., Hao, E., Piran, R., Keinan, E., & Levine, F. (2010a). Pancreatic β -Cell Neogenesis by Direct Conversion from Mature α -Cells. *Stem cells*, 28(9), 1630-1638.
- Chung, W. S., Andersson, O., Row, R., Kimelman, D., & Stainier, D. Y. (2010b). Suppression of Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic β -cells in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1142-1147.

- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes*, *54*(suppl 2), S97-S107.
- Collins, C. A., Wairkar, Y. P., Johnson, S. L., & DiAntonio, A. (2006). Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron*, *51*(1), 57-69.
- Collombat, P., & Mansouri, A. (2009). Turning on the β -cell identity in the pancreas.
- Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., ... & Mansouri, A. (2009). The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells. *Cell*, *138*(3), 449-462.
- Costes, S., Vandewalle, B., Tourrel-Cuzin, C., Broca, C., Linck, N., Bertrand, G., ... & Dalle, S. (2009). Degradation of cAMP-Responsive Element-Binding Protein by the Ubiquitin-Proteasome Pathway Contributes to Glucotoxicity in β -Cells and Human Pancreatic Islets. *Diabetes*, *58*(5), 1105-1115.
- Courtney, M., Pfeifer, A., Al-Hasani, K., Gjernes, E., Vieira, A., Ben-Othman, N., & Collombat, P. (2011). In vivo conversion of adult α -cells into β -like cells: a new research avenue in the context of type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *13*(s1), 47-52.
- Crabtree, G. R., & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, *109*(2), S67-S79.
- Dai, C., Brissova, M., Hang, Y., Thompson, C., Poffenberger, G., Shostak, A., ... & Powers, A. C. (2012). Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia*, *55*(3), 707-718.
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *The Lancet*, *367*(9513), 847-858.
- Del Prato, S., & Tiengo, A. (2001). The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *17*(3), 164-174.
- Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Nationale Versorgungsleitlinie (2014): <http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/evidenzbasierte-leitlinien.html>
- De Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, *7*(2), 725-737.
- Doeng-Sheng, T., Yuan, Y. H., Tu, H. J., Liang, Q. L., & Dai, L. J. (2009). A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nature protocols*, *4*(11), 1649-1652.
- Donath, M. Y., Størling, J., Maedler, K., & Mandrup-Poulsen, T. (2003). Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *Journal of molecular medicine*, *81*(8), 455-470.
- Donath, M. Y., & Halban, P. A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia*, *47*(3), 581-589.
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, *11*(2), 98-107.
- Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews Drug discovery*, *13*(6), 465-476.
- Donath, M. Y. (2016). Multiple benefits of targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia*, *59*(4), 679-682.
- Dong, H., Csernansky, C. A., Goico, B., & Csernansky, J. G. (2003). Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1742-1749.

- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., & Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429(6987), 41-46.
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., ... & Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), 12222-12226.
- Eisenbarth, G. S. (1986). Type I diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 314(21), 1360-1368.
- Emre, S., Genyk, Y., Schluger, L. K., Fishbein, T. M., Guy, S. R., Sheiner, P. A., ... & Miller, C. M. (2000). Treatment of tacrolimus-related adverse effects by conversion to cyclosporine in liver transplant recipients. *Transplant international*, 13(1), 73-78.
- España, J., Valero, J., Miñano-Molina, A. J., Masgrau, R., Martín, E., Guardia-Laguarta, C., ... & Saura, C. A. (2010). β -Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRT1. *Journal of Neuroscience*, 30(28), 9402-9410.
- Eto, K., Kawauchi, T., Osawa, M., Tabata, H., & Nakajima, K. (2010). Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. *Neuroscience research*, 66(1), 37-45.
- Fan, G., Merritt, S. E., Kortenjann, M., Shaw, P. E., & Holzman, L. B. (1996). Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24788-24793.
- Fernandez, L. A., Lehmann, R., Luzi, L., Battezzati, A., Angelico, M. C., Ricordi, C., ... & Alejandro, R. (1999). The effects of maintenance doses of FK506 versus cyclosporin A on glucose and lipid metabolism after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 68(10), 1532-1541.
- Ferraris, D., Yang, Z., & Welsbie, D. (2013). Dual leucine zipper kinase as a therapeutic target for neurodegenerative conditions. *Future medicinal chemistry*, 5(16), 1923-1934.
- Fex, M., Wierup, N., Nitert, M. D., Ristow, M., & Mulder, H. (2007). Rat insulin promoter 2-Cre recombinase mice bred onto a pure C57BL/6J background exhibit unaltered glucose tolerance. *Journal of Endocrinology*, 194(3), 551-555.
- Gabir, M. M., Hanson, R. L., Dabelea, D., Imperatore, G., Roumain, J., Bennett, P. H., & Knowler, W. C. (2000). The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes care*, 23(8), 1108-1112.
- Gallo, K. A., & Johnson, G. L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(9), 663-672.
- Gannon, M., Ables, E. T., Crawford, L., Lowe, D., Offield, M. F., Magnuson, M. A., & Wright, C. V. (2008). pdx-1 function is specifically required in embryonic β cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Developmental biology*, 314(2), 406-417.
- Gesina, E., Tronche, F., Herrera, P., Duchene, B., Tales, W., Czernichow, P., & Breant, B. (2004). Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes*, 53(9), 2322-2329.
- Ghosh, A. S., Wang, B., Pozniak, C. D., Chen, M., Watts, R. J., & Lewcock, J. W. (2011). DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *The Journal of cell biology*, 194(5), 751-764.
- Gijtenbeek, J. M. M., Van den Bent, M. J., & Vecht, C. J. (1999). Cyclosporine neurotoxicity: a review. *Journal of neurology*, 246(5), 339-346.
- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., ... & Navia, M. A. (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 82(3), 507-522.

- Guo, S., Burnette, R., Zhao, L., Vanderford, N. L., Poitout, V., Hagman, D. K., ... & Stein, R. (2009). The stability and transactivation potential of the mammalian MafA transcription factor are regulated by serine 65 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 759-765.
- Grigoriu, S., Bond, R., Cossio, P., Chen, J. A., Ly, N., Hummer, G., ... & Peti, W. (2013). The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol*, 11(2), e1001492.
- Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J. S., Sander, M., ... & Stein, R. (2013). Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), 3305-3316.
- Habener, J. F., Miller, C. P., & Vallejo, M. (1995). cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. *Vitamins & Hormones*, 51, 1-57.
- Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M., & Bastiani, M. (2009). Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science*, 323(5915), 802-806.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315(6015), 115-122.
- Hashimoto, N., Kido, Y., Uchida, T., Asahara, S. I., Shigeyama, Y., Matsuda, T., ... & Fujimoto, Y. (2006). Ablation of PDK1 in pancreatic β cells induces diabetes as a result of loss of β cell mass. *Nature genetics*, 38(5), 589-593.
- Hawa, M. I., Kolb, H., Schloot, N., Beyan, H., Paschou, S. A., Buzzetti, R., ... & Tuomilehto, J. (2013). Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype. *Diabetes care*, 36(4), 908-913.
- Heit, J. J., Apelqvist, Å. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R., & Kim, S. K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *Nature*, 443(7109), 345-349.
- Herrera, P. L., Huarte, J., Zufferey, R., Nichols, A., Mermillod, B., Philippe, J., ... & Vassalli, J. D. (1994). Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12999-13003.
- Herrera, P. L. (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development*, 127(11), 2317-2322.
- Hirai, S. I., Izawa, M., Osada, S. I., Spyrou, G., & Ohno, S. (1996). Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene*, 12(3), 641-650.
- Hirai, S. I., Kawaguchi, A., Hirasawa, R., Baba, M., Ohnishi, T., & Ohno, S. (2002). MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. *Development*, 129(19), 4483-4495.
- Hirai, S. I., Kawaguchi, A., Suenaga, J., Ono, M., & Ohno, S. (2005). Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. *Gene expression patterns*, 5(4), 517-523.
- Hirai, S. I., Miyata, T., Ogawa, M., Kiyonari, H., Suda, Y., Aizawa, S., ... & Ohno, S. (2006). The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 26(46), 11992-12002.
- Hirano, T., Manabe, T., Printz, H., & Tobe, T. (1992). Cytotoxic effects of cyclosporin A on the exocrine pancreas in rats. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 175(6), 495-500.

- Hisadome, K., Smith, M. A., Choudhury, A. I., Claret, M., Withers, D. J., & Ashford, M. L. J. (2009). 5-HT inhibition of rat insulin 2 promoter Cre recombinase transgene and proopiomelanocortin neuron excitability in the mouse arcuate nucleus. *Neuroscience*, *159*(1), 83-93.
- Ho, S., Clipstone, N., Timmermann, L., Northrop, J., Graef, I., Fiorentino, D., ... & Crabtree, G. R. (1996). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clinical immunology and immunopathology*, *80*(3), S40-S45.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*, *17*(18), 2205-2232.
- Holzman, L. B., Merritt, S. E., & Fan, G. (1994). Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(49), 30808-30817.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON*, *259*, 87-87.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., & Ellis, R. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science*, *271*(5249), 665.
- Huai, Q., Kim, H. Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J. O., & Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(19), 12037-12042.
- Huang, Y. W. A., Zhou, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2017). ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion. *Cell*, *168*(3), 427-441.
- Huntwork-Rodriguez, S., Wang, B., Watkins, T., Ghosh, A. S., Pozniak, C. D., Bustos, D., ... & Lewcock, J. W. (2013). JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, *202*(5), 747-763.
- Hussain, M. A., Porras, D. L., Rowe, M. H., West, J. R., Song, W. J., Schreiber, W. E., & Wondisford, F. E. (2006). Increased pancreatic β -cell proliferation mediated by CREB binding protein gene activation. *Molecular and cellular biology*, *26*(20), 7747-7759.
- Idilman, R. (1998). Cyclosporin/tacrolimus. *Reactions*, *709*, 11.
- International Diabetes Federation, *Diabetes Atlas*, 7. Auflage
- Itoh, A., Horiuchi, M., Wakayama, K., Xu, J., Bannerman, P., Pleasure, D., & Itoh, T. (2011). ZPK/DLK, a mitogen-activated protein kinase kinase kinase, is a critical mediator of programmed cell death of motoneurons. *Journal of Neuroscience*, *31*(20), 7223-7228.
- Jhala, U. S., Canettieri, G., Srean, R. A., Kulkarni, R. N., Krajewski, S., Reed, J., ... & Montminy, M. (2003). cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes & development*, *17*(13), 1575-1580.
- Jin, L., & Harrison, S. C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Kahn, C. R. (1994). Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, *43*(8), 1066-1085.
- Kahn, R. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus: the expert committee on the diagnosis and classifications of diabetes mellitus. *Diabetes care*, *26*(11), 3160.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, *383*(9922), 1068-1083.

- Kaiser, D., & Oetjen, E. (2014). Something old, something new and something very old: drugs for treating type 2 diabetes. *British journal of pharmacology*, 171(12), 2940-2950.
- Kanzler, S., Lohse, A. W., Schirmacher, P., Hermann, E., Otto, G., & Meyer, Z. B. K. (1996). Complete reversal of FK 506 induced diabetes in a liver transplant recipient by change of immunosuppression to cyclosporine A. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 34(2), 128-131.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature immunology*, 3(3), 221-227.
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., & Lewis, C. T. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*, 378(6557), 641.
- Klee, C. B., Ren, H., & Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13367-13370.
- Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda, S., Fuller, P. M., Krashes, M. J., ... & Lowell, B. B. (2012). GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell*, 151(3), 645-657.
- Köhler, P. O., & Bridson, W. E. (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(5), 683-687.
- Krüger, M., Schwaninger, M., Blume, R., Oetjen, E., & Knepel, W. (1997). Inhibition of CREB-and cAMP response element-mediated gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 in T cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 356(4), 433-440.
- Kuan, C. Y., Yang, D. D., Roy, D. R. S., Davis, R. J., Rakic, P., & Flavell, R. A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*, 22(4), 667-676.
- Kutschenko A: Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Calcineurin-Phosphatase, Dual-Leucine-Zipper-Bearing-Kinase (DLK), Insulingentranskription und Vitalität einer pankreatischen beta-Zelllinie (2008). Med. Diss. Göttingen.
- Kuzuya, T., & Matsuda, A. (1997). Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. *Diabetes care*, 20(2), 219-220.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(6), 527-536.
- Land WG. Immunsuppressive Therapie-Band 2. Stuttgart – New York: Thieme, 2004
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehse, J. A., Seifert, B., ... & Donath, M. Y. (2007). Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 356(15), 1517-1526.
- Lawrence, M. C., Bhatt, H. S., Watterson, J. M., & Easom, R. A. (2001). Regulation of insulin gene transcription by a Ca²⁺-responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. *Molecular endocrinology*, 15(10), 1758-1767.
- Leahy, J. L. (1990). Natural history of β -cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes care*, 13(9), 992-1010.
- Lee, J. Y., Ristow, M., Lin, X., White, M. F., Magnuson, M. A., & Hennighausen, L. (2006). RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic β -cell function. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2649-2653.

- Leung, I. W. L., & Lassam, N. (2001). The kinase activation loop is the key to mixed lineage kinase-3 activation via both autophosphorylation and hematopoietic progenitor kinase 1 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1961-1967.
- Li, H., Zhang, L., Rao, A., Harrison, S. C., & Hogan, P. G. (2007). Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of molecular biology*, 369(5), 1296-1306.
- Li, H., Rao, A., & Hogan, P. G. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in cell biology*, 21(2), 91-103.
- Li, W., Nakanishi, M., Zumsteg, A., Shear, M., Wright, C., Melton, D. A., & Zhou, Q. (2014). In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *Elife*, 3, e01846.
- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66(4), 807-815.
- Liu, J., Arai, K. I., & Arai, N. (2001). Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: disrupting the interaction of NFATx with calcineurin. *The Journal of Immunology*, 167(5), 2677-2687.
- Longnecker, D. S. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- Maedler, K., & Donath, M. Y. (2004). β -Cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Hormone Research in Paediatrics*, 62(Suppl. 3), 67-73.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., ... & Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of clinical investigation*, 110(6), 851-860.
- Mansouri, A. (2012). Development and regeneration in the endocrine pancreas. *ISRN endocrinology*, 2012.
- Markell, M. (2004). New-onset diabetes mellitus in transplant patients: pathogenesis, complications, and management. *American journal of kidney diseases*, 43(6), 953-965.
- Maroney, A. C., Finn, J. P., Connors, T. J., Durkin, J. T., Angeles, T., Gessner, G., ... & Scott, R. W. (2001). Cep-1347 (KT7515), a semisynthetic inhibitor of the mixed lineage kinase family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 25302-25308.
- Martínez-Martínez, S., Rodríguez, A., López-Maderuelo, M. D., Ortega-Pérez, I., Vázquez, J., & Redondo, J. M. (2006). Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6227-6235.
- Mata, M., Merritt, S. E., Fan, G., Yu, G. G., & Holzman, L. B. (1996). Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16888-16896.
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(8), 599-609.
- McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A., & Corbett, J. A. (1996). Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Experimental Biology and Medicine*, 211(1), 24-32.
- Melloul, D. (2008). Role of NF- κ B in β -cell death.
- Merritt, S. E., Mata, M., Nihalani, D., Zhu, C., Hu, X., & Holzman, L. B. (1999). The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10195-10202.

- Miller, B. R., Press, C., Daniels, R. W., Sasaki, Y., Milbrandt, J., & DiAntonio, A. (2009). A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nature neuroscience*, 12(4), 387-389.
- Montori, V. M., Basu, A., Erwin, P. J., Velosa, J. A., Gabriel, S. E., & Kudva, Y. C. (2002). Posttransplantation diabetes. *Diabetes care*, 25(3), 583-592.
- Musson, R., & Smit, N. (2011). Regulatory mechanisms of calcineurin phosphatase activity. *Current medicinal chemistry*, 18(2), 301-315.
- Nihalani, D., Merritt, S., & Holzman, L. B. (2000). Identification of structural and functional domains in mixed lineage kinase dual leucine zipper-bearing kinase required for complex formation and stress-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7273-7279.
- Nihalani, D., Meyer, D., Pajni, S., & Holzman, L. B. (2001). Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components. *The EMBO Journal*, 20(13), 3447-3458.
- Nihalani, D., Wong, H. N., & Holzman, L. B. (2003). Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28694-28702.
- Nihalani, D., Wong, H., Verma, R., & Holzman, L. B. (2007). Src family kinases directly regulate JIP1 module dynamics and activation. *Molecular and cellular biology*, 27(7), 2431-2441.
- Nikolaev, V. O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., & Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37215-37218.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., & Yamagishi, S. I. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404(6779), 787.
- Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., El Khattabi, I., Dodge, R., Bonner-Weir, S., & Sharma, A. (2006). A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β -cells. *Developmental biology*, 293(2), 526-539.
- Oetjen, E., Diedrich, T., Eggers, A., Eckert, B., & Knepel, W. (1994). Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 27036-27044.
- Oetjen, E., Grapentin, D., Blume, R., Seeger, M., Krause, D., Eggers, A., & Knepel, W. (2003a). Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 367(3), 227-236.
- Oetjen, E., Baun, D., Beimesche, S., Krause, D., Ciorny, I., Blume, R., ... & Knepel, W. (2003b). Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1289-1295.
- Oetjen, E., Thoms, K. M., Laufer, Y., Pape, D., Blume, R., Li, P., & Knepel, W. (2005). The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *British journal of pharmacology*, 144(7), 982-993.
- Oetjen, E., Lechleiter, A., Blume, R., Nihalani, D., Holzman, L., & Knepel, W. (2006). Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. *Diabetologia*, 49(2), 332-342.
- Oetjen, E., Blume, R., Ciorny, I., Schlag, C., Kutschenko, A., Krätzner, R., ... & Knepel, W. (2007). Inhibition of MafA transcriptional activity and human insulin gene transcription by interleukin-1 β and mitogen-activated protein kinase kinase kinase in pancreatic islet beta cells. *Diabetologia*, 50(8), 1678-1687.

- Oetjen, E. (2016). Regulation of Beta-Cell Function and Mass by the Dual Leucine Zipper Kinase. *Archiv der Pharmazie*, 349(6), 410-413.
- Oetjen, E., & Lemcke, T. (2016). Dual leucine zipper kinase (MAP3K12) modulators: a patent review (2010–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 26(5), 607-616.
- Oliver-Krasinski, J. M., & Stoffers, D. A. (2008). On the origin of the β cell. *Genes & development*, 22(15), 1998-2021.
- Pajunen, P., Peltonen, M., Eriksson, J. G., Ilanne-Parikka, P., Aunola, S., Keinänen-Kiukaanniemi, S., ... & Lindström, J. (2011). HbA1c in diagnosing and predicting type 2 diabetes in impaired glucose tolerance: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetic Medicine*, 28(1), 36-42.
- Panten, U., Willenborg, M., Schumacher, K., Hamada, A., Ghaly, H., & Rustenbeck, I. (2013). Acute metabolic amplification of insulin secretion in mouse islets is mediated by mitochondrial export of metabolites, but not by mitochondrial energy generation. *Metabolism*, 62(10), 1375-1386.
- Parkash, J., Chaudhry, M. A., & Rhoten, W. B. (2005). Tumor necrosis factor- α -induced changes in insulin-producing β -cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 286(2), 982-993.
- Patel, S., Cohen, F., Dean, B. J., De La Torre, K., Deshmukh, G., Estrada, A. A., ... & Le Pichon, C. E. (2014). Discovery of dual leucine zipper kinase (DLK, MAP3K12) inhibitors with activity in neurodegeneration models. *Journal of medicinal chemistry*, 58(1), 401-418.
- Patel, S., Harris, S. F., Gibbons, P., Deshmukh, G., Gustafson, A., Kellar, T., ... & Ma, C. (2015). Scaffold-Hopping and Structure-Based Discovery of Potent, Selective, And Brain Penetrant N-(1 H-Pyrazol-3-yl) pyridin-2-amine Inhibitors of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK, MAP3K12). *Journal of medicinal chemistry*, 58(20), 8182-8199.
- Phu, D.T., Wallbach, M., Depatie, C., Fu, A., Screaton, R. A., & Oetjen, E. (2011). Regulation of the CREB coactivator TORC by the dual leucine zipper kinase at different levels. *Cellular signalling*, 23(2), 344-353.
- Pickup, J. C., & Crook, M. A. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?. *Diabetologia*, 41(10), 1241-1248.
- Plaumann, S., Blume, R., Börchers, S., Steinfelder, H. J., Knepel, W., & Oetjen, E. (2008). Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of β -cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A. *Molecular pharmacology*, 73(3), 652-659.
- Plosker, G. L., & Foster, R. H. (2000). Tacrolimus. *Drugs*, 59(2), 323-389.
- Porte, D. (1991). β -cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes*, 40(2), 166-180.
- Pozniak, C. D., Ghosh, A. S., Gogineni, A., Hanson, J. E., Lee, S. H., Larson, J. L., ... & Jubb, A. M. (2013). Dual leucine zipper kinase is required for excitotoxicity-induced neuronal degeneration. *Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2553-2567.
- Pratley, R. E., & Weyer, C. (2001). The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44(8), 929-945.
- Reddy, U. R., & Pleasure, D. (1994). Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 202(1), 613-620.
- Reddy, Y. N., Abraham, G., Sundaram, V., Reddy, P. P., Mathew, M., Nagarajan, P., ... & Reddy, Y. N. (2015). Is there a genetic predisposition to new-onset diabetes after kidney transplantation?. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 26(6), 1113.
- Rhodes, C. J. (2005). Type 2 diabetes-a matter of β -cell life and death?. *Science*, 307(5708), 380-384.

- Rodríguez, A., Roy, J., Martínez-Martínez, S., López-Maderuelo, M. D., Niño-Moreno, P., Ortí, L., ... & Redondo, J. M. (2009). A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Molecular cell*, 33(5), 616-626.
- Roy, J., & Cyert, M. S. (2009). Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal*, 2(100), 9.
- Rusnak, F., & Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiological reviews*, 80(4), 1483-1521.
- Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., & Wagner, E. F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mechanisms of development*, 89(1), 115-124.
- Sakuma, H., Ikeda, A., Oka, S., Kozutsumi, Y., Zanetta, J. P., & Kawasaki, T. (1997). Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28622-28629.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Santerre, R. F., Cook, R. A., Crisel, R. M., Sharp, J. D., Schmidt, R. J., Williams, D. C., & Wilson, C. P. (1981). Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4339-4343.
- Shapiro, R., Carroll, P. B., Tzakis, A. G., Cemaj, S., Lopatin, W. B., & Nakazato, P. (1990). Adrenal reserve in renal transplant recipients with cyclosporine, azathioprine, and prednisone immunosuppression. *Transplantation*, 49(5), 1011-1012.
- Scantlebury, V., Shapiro, R., Fung, J., Tzakis, A., McCauley, J., Jordan, M., ... & Starzl, T. E. (1991, December). New onset of diabetes in FK 506 vs cyclosporine-treated kidney transplant recipients. In *Transplantation proceedings* (Vol. 23, No. 6, p. 3169). NIH Public Access.
- Screaton, R. A., Conkright, M. D., Katoh, Y., Best, J. L., Canettieri, G., Jeffries, S., ... & Okamoto, M. (2004). The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium-and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell*, 119(1), 61-74.
- Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 81-105.
- Shin, S., Le Lay, J., Everett, L. J., Gupta, R., Rafiq, K., & Kaestner, K. H. (2014). CREB mediates the insulinotropic and anti-apoptotic effects of GLP-1 signaling in adult mouse β -cells. *Molecular metabolism*, 3(8), 803-812.
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1793-1801.
- Stahnke, M. J., Dickel, C., Schröder, S., Kaiser, D., Blume, R., Stein, R., ... & Oetjen, E. (2014). Inhibition of human insulin gene transcription and MafA transcriptional activity by the dual leucine zipper kinase. *Cellular signalling*, 26(9), 1792-1799.
- Starzl, T., Fung, J., Venkataramman, R., Todo, S., Demetris, A., & Jain, A. (1989). FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *The Lancet*, 334(8670), 1000-1004.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Tanabe, K. (2003). Calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Drugs*, 63(15), 1535-1548.
- Tedeschi, A., & Bradke, F. (2013). The DLK signalling pathway—a double-edged sword in neural development and regeneration. *EMBO reports*, 14(7), 605-614.

- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003): Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26: 3160-3167.
- The Human Protein Atlas*, MAP3K12: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000139625-MAP3K12/tissue>
- The Pancreas Center, Columbia University (2016): <http://columbiasurgery.org/pancreas>
- Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., & Herrera, P. L. (2010). Conversion of adult pancreatic α -cells to β -cells after extreme β -cell loss. *Nature*, 464(7292), 1149-1154.
- Turner, J. D., Thomas, A. P., Reeves, J. P., & Hantash, B. M. (2009). Calcineurin activation by slow calcium release from intracellular stores suppresses protein kinase C regulation of L-type calcium channels in L6 cells. *Cell calcium*, 46(4), 242-247.
- Vallerie, S. N., & Hotamisligil, G. S. (2010). The role of JNK proteins in metabolism. *Science translational medicine*, 2(60), 60rv5-60rv5.
- Vasauskas, A. A., Chen, H., Wu, S., & Cioffi, D. L. (2014). The serine-threonine phosphatase calcineurin is a regulator of endothelial store-operated calcium entry. *Pulmonary circulation*, 4(1), 116-127.
- Ventura, J. J., Kennedy, N. J., Lamb, J. A., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003). c-Jun NH2-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2871-2882.
- Ventura, J. J., Cogswell, P., Flavell, R. A., Baldwin, A. S., & Davis, R. J. (2004). JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes & development*, 18(23), 2905-2915.
- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537-549.
- Wallbach, M. (2010). Identifikation einer funktionellen Kernerkenungssequenz in der Dual-Leucine-Zipper-Bearing Kinase (*Doctoral dissertation, Göttingen, Georg-August Universität, Diss., 2011*).
- Wallbach, M., Duque Escobar, J., Babaeikelishomi, R., Stahnke, M. J., Blume, R., Schröder, S., ... & Miosge, N. (2016). Distinct functions of the dual leucine zipper kinase depending on its subcellular localization. *Cellular signalling*, 28(4), 272-283.
- Welsh, N., Cnop, M., Kharroubi, I., Bugliani, M., Lupi, R., Marchetti, P., & Eizirik, D. L. (2005). Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets?. *Diabetes*, 54(11), 3238-3244.
- Wijdicks, E. F., Dahlke, L. J., & Wiesner, R. H. (1999). Oral cyclosporine decreases severity of neurotoxicity in liver transplant recipients. *Neurology*, 52(8), 1708-1708.
- Willenborg, M., Schumacher, K., & Rustenbeck, I. (2012). Determination of beta-cell function: insulin secretion of isolated islets. *Animal Models in Diabetes Research*, 189-201.
- World Health Organization (1965): Diabetes Mellitus: Report of a WHO Expert Committee. Geneva, *World Health Organisation* (Tech. Rep. Ser., no. 310).
- World Health Organization (1980): Expert Committee on Diabetes Mellitus. Geneva, *World Health Organisation* (Tech. Rep. Ser., no. 646).
- World Health Organization (1985): Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Geneva, *World Health Organisation* (Tech. Rep. Ser., no. 727).
- World Health Organization (1999): Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, *World Health Organisation*.

LITERATURVERZEICHNIS

World Health Organization/International Diabetes Federation (2006): Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. *Report of a WHO/IDF consultation*.

Xu, Z., Maroney, A. C., Dobrzanski, P., Kukekov, N. V., & Greene, L. A. (2001). The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 21(14), 4713-4724.

Yang, Y., Tandon, P., Liu, Z., Sarkisian, M. R., Stafstrom, C. E., & Holmes, G. L. (1998). Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. *Developmental brain research*, 107(2), 169-177.

Yang, Q., Wang, S., Hamberger, A., Celio, M. R., & Haglid, K. G. (1997). Delayed decrease of calbindin immunoreactivity in the granule cell-mossy fibers after kainic acid-induced seizures. *Brain research bulletin*, 43(6), 551-559.

Yocum, D. E., Furst, D. E., Bensen, W. G., Burch, F. X., Borton, M. A., Mengle-Gaw, L. J., ... & Tacrolimus RA Study Group. (2004). Safety of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis: long-term experience. *Rheumatology*, 43(8), 992-999.

Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., & Bogoyevitch, M. A. (2016). JNK signaling: regulation and functions based on complex protein-protein partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 793-835.

Zhang, Shaoying, and Ki-Han Kim. "TNF- α inhibits glucose-induced insulin secretion in a pancreatic β -cell line (INS-1)." *FEBS letters* 377.2 (1995): 237-239.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *nature*, 455(7213), 627-632.

8 Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Duque Escobar
Vorname: Jorge Enrique
Staatsangehörigkeit: deutsch, spanisch
geb.: 08.05.1985 in Jamundi Valle (Kolumbien)

Schulbildung

Sept. 1989 - Juli 1993 Grundschule La Merced (Jamundi, Kolumbien)
Sept. 1993 - Juli 2001 Technisches Gymnasium CEILM (Cali, Kolumbien)
Jan. 2002 - Jan 2004 Escuela Preparatoria (Las Palmas GC, Spanien)
Aug. 2004 - Juni 2007 Oberstufe am Technischen Gymnasium G17 (Hamburg)
Juni 2007 Abitur

Studium

Okt. 2007 - Juli 2011 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
Okt. 2011 Zweites Staatsexamen an der Universität Hamburg (Universitärer Abschluss, Pharmazeut)
Dez. 2011 - Dez. 2012 pharm. Praktisches Jahr (Burg-Apotheke, Dulsberg-Apotheke, Hamburg)
Dez. 2012 Drittes Staatsexamen/Approbation als Apotheker (Landesprüfungsamt)
Okt. 2014 - Juli 2016 Aufbaustudiengang Molekularbiologie (ASMB, ZMNH)

Kongressteilnahme

Vorträge

Der präsentierende Autor ist unterstrichen.

April 5. 2013 CEM introduces its research, UKE Hamburg
Reactive oxygen species-induced inhibition of calcineurin and activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase contribute to the loss of beta-cell function and mass.

Anna Kutschenko, Jorge Duque Escobar, Daniel Hasenpusch, Roland Blume, Thomas Lemcke, Elke Oetjen

April 15 - 17. 2013 11th German Islet Workshop, Dresden
Reactive oxygen species-induced inhibition of calcineurin and activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase contribute to the loss of beta-cell function and mass.

Anna Kutschenko, Jorge Duque Escobar, Daniel Hasenpusch, Roland Blume, Thomas Lemcke, Elke Oetjen

März 16 - 18. 2015 12th German Islet Workshop, Bremen
Direct regulation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase DLK by calcineurin

J. Duque Escobar, T. Lemcke, D. Hasenpusch, E. Oetjen

Juni 17. 2015 Tag der Pharmazie 2015, Hamburg
Bedeutung der Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) für die Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ 2

J. Duque Escobar, T. Lemcke, E. Oetjen

Poster

Januar 31-Februar 1. 2014 DZHK Retreat 2014, Tremsbüttel
Reactive oxygen species-induced inhibition of calcineurin and activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase contribute to the loss of beta-cell function and mass.

Anna Kutschenko, Jorge Duque Escobar, Daniel Hasenpusch, Roland Blume, Thomas Lemcke, Elke Oetjen

März. 10 - 12. 2015 DGE Jahrestagung 2015, Lübeck
Direct regulation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase DLK by calcineurin

J. Duque Escobar, T. Lemcke, D. Hasenpusch, E. Oetjen

März 18 - 21. 2015 DGPT Jahrestagung 2015, Kiel
Two putative calcineurin interaction domains within mitogen-activated protein kinase kinase kinase DLK

J. Duque Escobar, T. Lemcke, D. Hasenpusch, E. Oetjen

April 28. 2015 Studententagung zur innovativen Medizin- und Biotechnologie, Hamburg

Direkte Regulation der Beta-Zellschädigenden Kinase DLK durch die Beta-Zellprotektive Phosphatase Calcineurin

Duque Escobar, J.; Lemcke, T.; Oetjen, E.

September 22 - 25. 2015 DPhG Jahrestagung 2015, Düsseldorf

Regulation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase DLK by calcineurin

Duque Escobar, J.; Lemcke, T; Hasenpusch, D.; Oetjen, E.

Juni 15.2016 Tag der Pharmazie 2016, Hamburg

Protein Purification for Protein Protein Interaction between DLK and Calcineurin

Kreißig J, Mirsaidi G, Duque Escobar J, Lemcke T, Oetjen E

Okt. 04 - 07. 2016 DPhG Jahrestagung 2016, München

Disrupting the interaction between calcineurin and the dual leucine zipper kinase (DLK) increases kinase activity

Duque Escobar, J.; Lemcke, T; Oetjen, E.

März 06 - 09. 2017 DGPT Jahrestagung 2017, Heidelberg

Disrupting the interaction between calcineurin and the dual leucine zipper kinase (DLK) increases kinase damaging effect on β -cells

Duque Escobar, J.; Lemcke, T.; Oetjen, E.

Publikationen

Geteilte Erstautorschaft:

Wallbach M[#], Duque Escobar J[#], Babaeikelishomi R[#], Stahnke MJ, Blume R, Schröder S, Kruegel J, Maedler K, Kluth Oliver, Kehlenbach RH, Miosge N, Oetjen E: "Distinct functions of the dual leucine zipper kinase depending on its subcellular localization." Cell Signal. 2016 Apr; 28(4)272-83

#M.W., J.D.E. and R.B. contributed equally

Koautorschaft:

Börchers S, Babaeikelishomi R, Klimpel C, Duque Escobar J, Schröder S, Blume R, Malik M, Oetjen E: "TNF α -induced DLK activation contributes to beta-cell apoptosis" (in Revision)

Weitere wissenschaftliche Leistungen

Seit 01.04.17 Forschungsförderungsfond der Medizinischen Fakultät
Übergangsstelle nach der Doktorarbeit (Post-Doc-Stelle) für Nicht-Mediziner
(01.04.17).

Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS (H- und P-Sätze)

Gefahrenhinweise H-Sätze

- H200 Instabil, explosiv.
- H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H221 Entzündbares Gas.
- H222 Extrem entzündbares Aerosol.
- H223 Entzündbares Aerosol.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H229 Behälter steht unter Druck: kann bei Erwärmung bersten.
- H230 Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.
- H231 Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.
- H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H281 Enthält tiefkaltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Gefahrenhinweise für Gesundheitsgefahren

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.

- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden (entfällt, wenn auch H314).
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem an-deren Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt). (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition. (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition. (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H300+H310 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H300+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.
- H301+H330 Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H300+H310+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H301+H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H301+H331 Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
- H311+H331 Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.

- H302+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
- H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen (entfällt, wenn auch H410).
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
- H420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

Sicherheitshinweise – Prävention

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.
- P222 Keinen Kontakt mit Luft zulassen.
- P223 Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.
- P230 Feucht halten mit ...
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen/...verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
- P244 Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.
- P250 Nicht schleifen/stoßen/.../reiben.
- P251 Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft/der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Handhabung... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- P282 Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P283 Schwer entflammbare/flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 (Bei unzureichender Lüftung) Atemschutz tragen.
- P231+P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.

- P235+P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P301 BEI VERSCHLUCKEN
- P302 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT
- P303 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar)
- P304 BEI EINATMEN
- P305 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN
- P306 BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG
- P308 BEI Exposition oder falls betroffen
- P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- P311 GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/... anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser/... waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P364 Und vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr bei Brand.
- P373 KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemisch/Erzeugnisse erreicht.
- P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.

- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301+P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt... anrufen.
- P301+P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt... anrufen.
- P301+P330+P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P302+P334 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser/... waschen.
- P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar):
Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304+P340 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
- P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306+P360 BEI KONTAKT MIT DER KLEIDUNG: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P308+P311 BEI Exposition oder falls betroffen:
GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt... anrufen.
- P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P332+P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335+P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/ nassen Verband anlegen.
- P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342+P311 Bei Symptomen der Atemwege:
GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt...anrufen.
- P361+P364 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P362+P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P370+P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370+P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P370+P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370+P380+P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371+P380+P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen. Sicherheitshinweise – Aufbewahrung
- P401 .. aufbewahren.
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem/... Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen nicht über ...°C/...°F aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen über 50 °C/ 122 °F aussetzen.
- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/... lbs bei Temperaturen von nicht mehr als ...°C/...°F aufbewahren.
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P422 Inhalt in/unter ... aufbewahren.
- P402+P404 An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P403+P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
- P403+P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
- P410+P403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410+P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.
- P411+P235 Bei Temperaturen nicht über ...°C/...°F aufbewahren. Kühl halten.
Sicherheitshinweise – Entsorgung
- P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.
- P502 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.

9 Danksagung

Der erste Dank geht selbstverständlich an Prof. Dr. Elke Oetjen, denn sie gab mir die Möglichkeit, dieses spannende und faszinierende Thema in ihrer Arbeitsgruppe zu realisieren (Zitat: „*Lieber Herr Escobar, sehr gerne können wir uns über eine mögliche Promotionsstelle in der Pharmakologie oder speziell in meinem Arbeitsbereich unterhalten*“; Montag, 14.11.2011 18:47:54). Ich danke ihr auch für ihre konstruktive Kritik, ihre lehrreichen Diskussionen, ihre guten Ratschläge und schließlich für die ausgezeichnete Betreuung. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich und ihr Büro war stets immer offen für Probleme, Verbesserungsvorschläge oder Anregungen. Ebenfalls möchte ich mich für die Unterstützung zur Erstellung von Präsentationen und Postern und für all die Kongresse, zu denen ich fahren durfte, um meine Arbeit zu präsentieren. Selbstverständlich danke ich ihr auch für die wöchentliche Bereitstellung von Vitaminen in Form von Ananas, Papaya und/oder Melone.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei Anja Pahl und Diana Kaiser für die Einführung in die ersten Labortechniken und die Vermittlung von Grundlagen bedanken. Sie waren sehr hilfsbereit während meiner ersten Monate im Labor.

Ein großes Dankeschön geht an Sabine Schröder. Sabine hat durch ihre Erfahrung mein wissenschaftliches Wissen exponentiell gesteigert. Die „gute Seele“ im Labor wusste immer, was zu tun ist, wenn Techniken keine Ergebnisse lieferten. Außerdem hat sie mir durch ihre lustige, fürsorgliche und mütterliche Art gezeigt, dass bestimmte Angelegenheiten (privat oder geschäftlich) manchmal mehr Zeit und Geduld erfordern als andere. Sie hat mir immer das Gefühl gegeben, dass alles aus einem bestimmten Grund geschieht. Sie legte auch einen besonderen Wert darauf, dass ich mich während meiner Promotion wohl ernähre. Durch Sätze wie „geblottet ist geblottet oder gebunden ist gebunden“ ist sie für mich unsterblich geworden.

An Karoline Morhenn geht ein besonderes Dankeschön. Als meine „Mitdotorandin“ sind wir zusammen wissenschaftlich groß geworden. Sie war mir immer eine Stütze, wenn ich etwas nicht verstand oder Probleme jeglicher Art mit der Erstellung von Postern oder Präsentationen hatte. Ihre konstruktive Kritik schätzte ich sehr. Der Besuch von Kongressen an ihrer Seite war besonders entspannt und lustig. Ich hätte mir keine bessere Kollegin als Karoline vorstellen können.

DANKSAGUNG

Ich danke auch dem Doktorandennachwuchs unserer kleinen Arbeitsgruppe Anna Gundler und Kyra Köster dafür, dass sie sind wie sie sind. Sie haben eine beneidenswerte positive Einstellung dem Leben gegenüber und machen die Arbeit im Labor lustiger denn je. Anne Ruge als die Neueste in der Arbeitsgruppe danke ich, weil sie mir während der Zeit des Schreibens die Arbeit mit den Mäusen abnahm und mich dadurch entlastete.

Ich danke auch Prof. Rainer Böger für die Möglichkeit eine Promotion in seinem Institut machen zu dürfen sowie Prof. Thomas Eschenhagen und Lucie Carrier für die konstruktive Kritik und Feedback im Rahmen des *thursday scientific meetings* (TSM).

Ich danke unseren Kooperationspartner Prof. Viacheslav Nikolaev, Irm Hermans-Borgmeyer (und Peggy und Sarah), Thomas Lemcke (und Christina B.) und Wolfgang Maison (und Claudia W.) für die angenehme Zusammenarbeit, die lehrreichen Unterhaltungen und Praktika sowie für die geschriebenen Gutachten für meine Abschlussförderung.

Herzlichen Dank geht auch an alle bisher nicht genannten Mitarbeiter der Institute für Klinische und Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie. Ihr habt in gewisser Weise, dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit so verwirklichen konnte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Großeltern dafür, dass sie mich großgezogen haben und mir immer klar gemacht haben, dass ich meine eigene Zukunft außerhalb Kolumbien aufbauen sollte. Auch wenn es für sie bedeuten würde, mich aufzugeben. Meiner Mutter danke ich, weil sie mit 15 Jahren die Entscheidung traf für mich zu sorgen und letztlich Kolumbien verließ, um mir eine bessere Zukunft zu ermöglichen. Ich weiß nun, woher ich diesen Kampfgeist habe.

Meinen Freunden danke ich, weil ohne sie, hätte ich die Promotion seelisch nicht überstanden. Marie, dir danke ich besonders fürs Zuhören und für das Lesen und Beurteilen dieser Arbeit. Und Robert, mein bester Freund, ich danke dir dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast und immer und bedingungslos für mich da bist.

Álvaro, dir danke ich, weil ich mein Leben mit dir teilen darf und Du mich so wahnsinnig glücklich machst.

10 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende, an der Universität Hamburg eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Die Rolle der Dual Leucine-Zipper Kinase (DLK) für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Elke Oetjen am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verfasst. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 07.April.2017


Jorge Enrique Duque Escobar