

**Charakterisierung und Rolle Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine in
Insulin-sezernierenden Zellen**

**Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von
Martin Rösler
aus Frankfurt/Main**

Hundt Druck, Köln

Köln, den 07.03.2003

**No beast so fierce but knows some touch of pity.
But I know none, and therefore am no beast.**

Richard III. , William Shakespeare

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IX
Einheiten.....	X
Abstract.....	XI
Zusammenfassung.....	XII
1. Einleitung	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.2. Das Hormon Insulin	1
1.3. Regulation der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle.....	3
1.3.1. Proximale Effekte der Insulinsekretion.....	3
1.3.1.1. Inhibition der Insulinsekretion über heterotrimere G-Proteine	3
1.3.1.1.1. Aktivierung heterotrimerer G-Proteine	3
1.3.1.1.2. G-Protein Untereinheiten als Signalmoleküle	4
1.3.1.1.3. Klassifizierung der G-Protein Untereinheiten	4
1.3.1.1.4. Nachweis der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten	5
1.3.1.1.5. Inhibition der Insulinsekretion durch PTX-sensitive G-Proteine.....	6
1.3.1.2. Stimulation der Insulinsekretion durch Glukose	8
1.3.1.3. Stimulation der Insulinsekretion durch Acetylcholin	8
1.3.2. Distale Effekte der Insulinsekretion.....	9
1.3.2.1. Die Proteinphosphatase 2B Calcineurin (PP2B)	9
1.3.2.2. Der SNARE-Komplex	10
1.4. Vergleich der pankreatischen β -Zelle mit der Insulinomazelllinie INS-1	12
1.5. Zielsetzung der Doktorarbeit.....	12
1.5.1. Nachweis der $G\alpha i/o$ Untereinheiten im Modellsystem INS-1.....	13
1.5.2. Differenzierte Manipulation der $G\alpha i/o$ durch selektive Repression.....	13
1.5.3. Vergleich und Charakterisierung transienter und stabiler Repression.....	13
1.5.4. Analyse der Calcineurin-Phosphorylierung in INS-1 Zellen.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Substanzen und Lösungen.....	15
2.1.1. Zellkultur.....	15
2.1.2. Molekularbiologie	15
2.1.3. Proteinbiochemie.....	17
2.1.4. Immuncytochemie	18
2.2. Zellkultur.....	19

2.2.1.	Auftauen der Zellen	19
2.2.2.	Zellpassagierung	19
2.2.3.	Kryokonservierung	19
2.2.4.	Stimulation von INS-1 Zellen zur Analyse der Proteinphosphorylierung.....	20
2.2.5.	Zellkultur genetisch veränderter INS-1 Zellen	21
2.2.6.	Transfektion von INS-1 Zellen mittels Elektroporation	21
2.2.7.	Transient transfizierte INS-1 Mischklone	22
2.2.8.	Selektion stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone.....	23
2.3.	Molekularbiologie	24
2.3.1.	RNA-Extraktion und die Polymerasekettenreaktion	24
2.3.1.1.	RT-PCR: RNA-Isolierung und cDNA aus INS-1 Zellen	24
2.3.1.2.	Die Polymerasekettenreaktion.....	24
2.3.2.	Klonierung der PCR-Produkte	27
2.3.2.1.	Isolierung und Reinigung der PCR-Produkte	27
2.3.2.2.	Der Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO	27
2.3.2.3.	Ligation der PCR-Produkte.....	29
2.3.3.	Bakterielle Transformation und Selektion	30
2.3.3.1.	Herstellung kompetenter E. coli XL1-Blue (modifiziert nach Maniatis) ⁽¹²⁷⁾	30
2.3.3.2.	Hitzeschocktransformation kompetenter E.coli	30
2.3.3.3.	Selektion transformierter E.coli-Kolonien	31
2.3.4.	Analyse der Bakterien-Klone	31
2.3.4.1.	Analytische Plasmidpräparation aus E.coli	31
2.3.4.2.	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.3.5.	Identifizierung und Analyse positiver Bakterienklone	32
2.3.5.1.	Enzymatische Restriktionsanalyse	32
2.3.5.2.	Enzymatische Restriktion mit verschiedenen Temperaturoptima/Puffern.....	33
2.3.5.3.	Horizontale Agarosegelelektrophorese	33
2.3.5.4.	Sequenzierung vektorieller DNA.....	34
2.3.5.5.	Konservierung positiver Bakterien-Klone	34
2.3.6.	Anreicherung und Isolierung der DNA positiver Bakterienklone.....	35
2.3.6.1.	Vermehrung rekombinanter Klone	35
2.3.6.2.	Präparative Plasmidpräparation.....	35
2.3.7.	Herstellung der Sense-/Antisense-EGFP-Fusionskonstrukte.....	36
2.3.7.1.	Der Mammalia-Expressionsvektor pEGFPC1	36
2.3.7.2.	Enzymatische Isolierung der PCR-Produkte aus pCR2.1TOPO	37
2.3.7.3.	Isolierung der PCR-Fragmente mittels Gelextraktion	37
2.3.7.4.	Ligation.....	38
2.4.	Proteinchemie	39

2.4.1.	Aufbereitung der Proteinproben.....	39
2.4.1.1.	Gewinnung von Gesamtzellhomogenaten	39
2.4.1.2.	Gewinnung von partikulären Membranfraktionen nach Regazzi et al. (128)	39
2.4.2.	Proteinbestimmung nach Neuhoff (129)	39
2.4.3.	SDS-PAGE nach Laemmli (130).....	40
2.4.4.	Semi-Dry-Westernblotting nach Towbin (131)	41
2.4.5.	Ponceau S-Färbung der Westernblots.....	42
2.4.6.	Antikörper-Inkubation	42
2.4.6.1.	G-Protein-Antikörper.....	42
2.4.6.2.	Phosphoserin-/Phosphothreonin-Antikörper	43
2.4.7.	ECL Enhanced Chemolumineszenz	43
2.5.	Immuncytochemie	45
2.5.1.	Ausplattieren und Fixierung der Zellen	45
2.5.2.	Immuncytochemische Behandlung der INS-1 Zellen	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten in INS-1 Zellen.....	47
3.1.1.	Molekularbiologischer Nachweis mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)...	47
3.1.1.1.	Nachweis der Transkripte für $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$	47
3.1.1.2.	Identifizierung der PCR-Produkte	50
3.1.1.3.	Sequenzierung der PCR-Produkte	51
3.1.2.	Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten auf Translationsebene	51
3.1.2.1.	Nachweis mit Antikörpern (Biomol).....	51
3.1.2.2.	Nachweis mit Antikörpern (SCBT)	52
3.1.2.3.	Immuncytochemischer Nachweis der G-Proteine in INS-1 Zellen.....	53
3.2.	Etablierung von G-Protein-Antisense INS-1 Mischzellklonen.....	54
3.2.1.	Subklonierung der PCR-Produkte in pCR2.1TOPO	54
3.2.2.	Enzymatische Analyse der Orientierung in pCR2.1TOPO	56
3.2.3.	Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pEGFPC1	57
3.2.4.	Nachweis der Sense-/Antisense-Fragmente im Vektor pEGFPC1	59
3.3.	Analyse transient transfizierter INS1-Mischzellklone.....	59
3.3.1.	Transfektion von INS-1 Zellen und Ermittlung der Transfektionsrate	59
3.3.2.	Fluoreszenznachweis der transient transfizierten INS-1 Mischzellklone	61
3.4.	Quantifizierung des G-Proteingehaltes in transfizierten INS-1 Mischzellklonen ..	62
3.4.1.	Quantifizierung der $G\alpha 1$ -Untereinheit in $G\alpha 1$ -Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen	63

3.4.2.	Quantifizierung der G α 2-Untereinheit in G α 2-Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen	64
3.4.3.	Quantifizierung der G α 3-Untereinheit in G α 3-Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen	65
3.4.4.	Insulinsekretion in Antisense-transfizierten INS-1 Mischzellklonen	66
3.5.	Durchföhrung EGFP-negativer Antisense-Transfektionen	67
3.5.1.	Ausschneiden des EGFP-Gens	67
3.5.2.	Kontrolle der EGFP defizienten Vektor-Konstrukte	69
3.5.3.	Herstellung transient transfizierter INS-1 Mischzellklone mit EGFP-negativen Antisense-Konstrukten	71
3.5.4.	Quantifizierung pEGFPC1-G α 3C4AS transfizierter INS-1 Mischzellklone	71
3.6.	Etablierung stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone	75
3.6.1.	Durchföhrung der Transfektion und Etablierung stabil transfizierter Einzelzellklone	75
3.6.2.	Durchmusterung der G α 3-Proteinrepression in stabilen INS-1 Einzelzellklonen	75
3.6.3.	Quantifizierung der G α 3-Proteinrepression im stabilen INS-1 Einzelzellklon C1	77
3.6.4.	Quantifizierung der G α 3-Proteinrepression im stabilen INS-1 Einzelzellklon C7	79
3.6.5.	Insulinsekretion in G α 3-Antisense-transfizierten INS-1 Einzelzellklonen	81
3.6.6.	Weitere Analysen	82
3.6.6.1.	Analyse der Spezifität der G α 3-Repression in pEGFPC1-G α 3C4AS INS-1 Klon C7 und Analyse der G α o-Repression in pEGFPC1-G α oC5AS INS-1 Klon C17	82
3.7.	Analyse der Proteinphosphorylierung in stimulierten INS-1-Zellen	84
4.	Diskussion	86
4.1.	Planung der spezifischen und selektiven Proteinrepression unter Verwendung der Antisense-Technik	86
4.1.1.	Die Antisense Technik als Methode zur funktionellen Proteinanalyse	86
4.1.2.	Wahl des Antisense-Ansatzes	88
4.1.3.	Wahl der Antisense-Sequenzen	89
4.1.4.	Analyse der DNA/RNA Sekundärstrukturen	90
4.1.5.	Antisense induzierte G-Protein-Repression	90
4.2.	Nachweis der G-Proteine in INS-1 Zellen	90
4.2.1.	Nachweis im Westernblot	90
4.2.2.	Nachweis mittels der Immuncytochemie	91

4.3.	Repression der G-Proteine zur funktionellen Analyse.....	92
4.3.1.	Repression der G-Proteine: Wahl des Antisense-Ansatzes	92
4.3.2.	Klonierung der Antisense-Konstrukte	93
4.3.2.1.	PCR der Pertussistoxin-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten	93
4.3.2.2.	Subklonierung der PCR-Produkte.....	93
4.4.	Etablierung transienter INS-1 Mischzellklone.....	93
4.4.1.	EGFP-Fluoreszenz als Beweis für die erfolgreiche Transfektion.....	93
4.4.2.	Analyse der Proteinrepression transient transfizierter INS-1 Mischzellklone	94
4.4.3.	Insulinsekretionsstudien	94
4.4.4.	Ursachen für die fehlende Repression.....	94
4.5.	Etablierung und Analyse stabiler INS-1 Einzelzellklone	95
4.5.1.	Der Mischzellklon pEGFPC1-G α i3C4AS	95
4.5.2.	Etablierung und Analyse stabiler INS-1 Einzelzellklone	96
4.5.3.	Insulinsekretionsstudien der G α i3-reprimierten INS-1 Einzelzellklone	96
4.6.	Analyse der Phosphorylierungsstudien.....	97
4.7.	Zusammenfassung.....	97
4.8.	Ausblicke.....	98
5.	Anhang.....	100
5.1.	Fremdexperimente	100
5.1.1.	Insulinsekretionsstudien transient transfizierter INS-1 Zellen.....	100
5.1.2.	Insulinsekretionsstudien stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone	101
5.2.	Sequenzhomologievergleich der G-Protein α -Untereinheiten G α i1, G α i2, G α i3 und G α o-Wahl der Antisense-Sequenzen.....	103
5.3.	Vektor und Fragmentberechnungen	106
5.3.1.	Größe der Vektoren und Konstrukte	106
5.3.2.	Größe der Fragmente bei Feststellung der Existenz und Orientierung in den Vektoren pCR2.1TOPO und pEGFPC1	107
5.4.	Literaturverzeichnis	108
5.5.	Nomenklatur der Bakterien- und INS-1 Zellklone.....	120
5.6.	Eidesstattliche Erklärung	122
5.7.	Danksagung	123
5.8.	Lebenslauf.....	124

Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase (Adenylyl Cyclase)
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Antisense (auch upstream oder reverse)
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diazylglyzerol
DM	Diabetes Mellitus
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EP	Elektroporationspuffer: Vollmedium ohne FCS
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Rinderserum (Fetal Calf Serum)
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK	G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter K ⁺ -Kanal (G protein-coupled inward rectifying K ⁺ channel)
GLUT-2	Glukose-Transporter der β -Zellen
GLUT-4	Glukose-Transporter der Leber- und Muskelzellen
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus (Insulin dependent Diabetes Mellitus)
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRES	Intra Ribosomal Entry Site
KIR	Einwärtsgerichteter K ⁺ -Kanal (K ⁺ channel inward rectifying)
LDCVs	Speicher- und Sekretionsvesikel des Insulins (Large Dense Core Vesicles)
MAP-2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
MCS	Multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site)
NIDDM	Insulin-unabhängiger Diabetes Mellitus (Non Insulin dependent Diabetes Mellitus)
NSF	N-ethylmaleimide-sensitiver Factor
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDE	Phosphodiesterase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2B	Proteinphosphatase 2B (Calcineurin)
PTX	Pertussistoxin
RIA	Radioimmunoassay
S	Sense (auch downstream oder forward)
SNAP-23	Synaptosomen assoziiertes Protein (23 kD)
SNAP-25	Synaptosomen assoziiertes Protein (25 kD)
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor (Sulfonyl Urea Receptor)
t-SNARE	Target-Membran SNAP-Rezeptor
VAMP	Vesikel assoziiertes Membranprotein
VDCCs	spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle (Voltage dependent Ca ²⁺ Channels)
VM	Vollmedium
v-SNARE	vesikulärer SNAP-Rezeptor

Einheiten

kD	Kilodalton
MW/Mr	Molekulargewicht/relative Molekülmasse
sec	Sekunden
min	Minuten
h	Stunden
d	Tage
bp	Basenpaare
kb	Kilobasen
gr	Gramm
g	Erdbeschleunigung
rpm	Umdrehung pro Minute

Abstract

Dysfunctions of heterotrimeric G-proteins are assumed to be the reason for insulin dependent (IDDM) and non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The inhibition of insulin release in INS-1 cells, a rat insulinoma cell line, is mediated by the α_2 -adrenergic receptor. The activation of this receptor by the extracellular binding of adrenaline leads to activation of pertussis toxin sensitive G-Proteins which in turn inhibit the adenylyl cyclase and thereby reduce the generation of cAMP. The reduction of intracellular cAMP concentration leads to reduced activity of the cAMP dependent protein kinase A and thereby to an inhibition of the insulin secretion. The aim of the present study was to elucidate the expression of pertussis toxin sensitive heterotrimeric G-proteins $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_i3$ and $G\alpha_o$ and to analyse the role and function of these proteins in INS-1 cells by using the antisense technique.

The analysis of the phosphorylation of the proteinphosphatase 2B (calcineurin) and the SNARE proteins, which are known to be involved into neuronal transmitter release, was another aim of this study.

Using three different sets of antibodies the expression of $G\alpha_i3$ and $G\alpha_o$ was shown in INS-1 cells by westernblotting as well as by immunocytochemistry, while $G\alpha_i1$ and $G\alpha_i2$ were not detected. Complementary DNA-fragments of $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_i3$ and $G\alpha_o$ were cloned in antisense orientation into the multiple cloning site of the mammalian expression vector pEGFPC1 and by that coupled to the expression of the enhanced green fluorescent protein (EGFP). The analysis of transiently transfected INS-1 mixed cell clones did not show any repression of $G\alpha$ subunits on westernblots. Secretion studies using the radioimmunoassay revealed that antisense-EGFP transfected INS-1 mixed cells do not show any alterations in insulin secretion.

After excision of the EGFP gene from the expression vector transiently and stably transfected INS-1 cells were established with antisense constructs directed against the different G-protein subunits. The comparison of untransfected INS-1 control cells with $G\alpha_i3$ -antisense transiently transfected INS-1 mixed clones showed a reduction of G-protein content of $G\alpha_i3$ to 54.5%. Quantitative westernblot analysis of 24 single cell clones for each $G\alpha$ -subunit selected by geneticin established two stable transfected INS-1 single cell clones with reduced $G\alpha_i3$ content and one clone with reduced $G\alpha_o$ content: pEGFPC1- $G\alpha_i3$ C4AS single cell clone C1 and C7 and pEGFPC1- $G\alpha_o$ C5AS single cell clone C17. The content of $G\alpha_i3$ in single cell clone C1 was reduced to 42%, the $G\alpha_i3$ content in clone C7 was reduced to 13%; $G\alpha_o$ was reduced to 78%. $G\alpha_i3$ deficient single cell clone C7 showed no unspecific reduction of the $G\alpha_o$ and therefore proving the specific repression of $G\alpha_i3$. However secretion studies using the radioimmunoassay showed no alterations in insulin secretion in $G\alpha_i3$ repressed pEGFPC1- $G\alpha_i3$ C4AS single cell clone C7.

Quantitative westernblot analysis using specific anti-phosphoserine/-threonine antibodies were performed to investigate the phosphorylation pattern of proteins like calcineurin or SNARE proteins of INS-1 cells after stimulation. Two different antibodies did not show comparable results in the pattern of phosphorylated proteins in stimulated INS-1 cells. $G\alpha_i3$ repressed INS-1 cells showed no alterations in insulin secretion, which leads to the conclusion that $G\alpha_i3$ is not involved in insulin secretion. Inhibition of insulin secretion in INS-1 cells is PTX sensitive, but $G\alpha_i1$ and $G\alpha_i2$ could not be detected in these cells. Therefore the involvement of PTX sensitive $G\alpha$ subunit $G\alpha_o$ in mediating the inhibition of insulin secretion is likely. This needs to be proven by further studies.

Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass Fehlfunktionen heterotrimerer G-Proteine eine Ursache für den Ausbruch sowohl des Insulin-abhängigen (IDDM) als auch des Insulin-unabhängigen Diabetes Mellitus (NIDDM) sind. Die Inhibition der Insulinsekretion in INS-1 Zellen, einer Ratten-Insulinomazelllinie, wird vermittelt durch den α_2 -adrenergen Rezeptor. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch die extrazelluläre Bindung von Adrenalin an diesen führt zur Aktivierung Pertussistoxin (PTX)-sensitiver G-Proteine, die nachfolgend die Adenylatzyklase inhibieren und so die Bildung des cAMPs reduzieren. Die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Verringerung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A und dadurch zur Inhibition der Insulinsekretion. Das Hauptziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die Expression der PTX-sensitiven, heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ sowie deren Funktion bei der Insulinsekretion in INS-1 Zellen mit Hilfe der Antisense-Technik zu untersuchen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Phosphorylierung der Proteinphosphatase 2B (PP2B, Calcineurin) und der SNARE-Proteine, deren Involvierung in die neuronale Transmitterfreisetzung bekannt ist, in INS-1 Zellen zu untersuchen.

Bei Verwendung verschiedener gegen $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ gerichteter Antikörper konnte die Expression von $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ im Westernblot und in immunocytochemischen Präparationen in INS-1 Zellen nachgewiesen werden; $G\alpha_1$ und $G\alpha_2$ konnten nicht detektiert werden. Komplementäre DNA-Fragmente von $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ -Transkripten wurden in Antisense-Orientierung in die Multiple Cloning Site des Mammalia-Expressionsvektors pEGFPC1 kloniert und so an die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) gekoppelt. Die Analyse der transient transfizierten INS-1 Mischzellklone zeigte keine Repression der $G\alpha$ -Untereinheiten im Westernblot bei Verwendung der etablierten Antikörper. Sekretionsstudien, die mit Hilfe des Radioimmunoassays durchgeführt wurden, zeigten, dass die Antisense-EGFP transfizierten INS-1 Mischzellklone keine Veränderung der Insulinsekretion aufwiesen.

Nach Entfernen des EGFP-Gens aus dem Expressionsvektor wurden transient transfizierte INS-1 Mischzellklone und stabil transfizierte INS-1 Einzelzellklone mit gegen die $G\alpha$ -Untereinheiten gerichteten Antisense-Konstrukten etabliert. Der Vergleich nichttransfizierter INS-1 Kontrollzellen mit $G\alpha_3$ -Antisense transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen zeigte eine Reduktion des $G\alpha_3$ -Gehaltes um 54.5% im Westernblot.

Anschließend wurden für jede $G\alpha$ -Untereinheit ($G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$) jeweils 24 Einzelzellklone mittels Geneticin (G418) selektioniert und so als stabil transfizierte Zelllinien etabliert. Quantitative Westernblotanalysen der insgesamt 96 Einzelzellklone zeigten einen reduzierten G-Proteingehalt in 3 der stabil transfizierten Einzelzellklone, in zwei Einzelzellklonen mit reduziertem $G\alpha_3$ -Gehalt (pEGFPC1- $G\alpha_3$ C4AS C1 und C7) und in einem Klon mit reduziertem $G\alpha_o$ -Gehalt (pEGFPC1- $G\alpha_o$ C5AS C17). Der $G\alpha_3$ -Gehalt im Einzelzellklon C1 war auf 42% reduziert, der $G\alpha_3$ -Gehalt in Klon C7 auf 13%. Der $G\alpha_o$ -Gehalt im Einzelzellklon C17 betrug 78%. Der $G\alpha_3$ -defiziente Einzelzellklon C7 zeigte keine unspezifische Reduktion des $G\alpha_o$ -Gehaltes, wodurch bewiesen wurde, dass die Repression der $G\alpha_3$ -Untereinheit spezifisch war. Allerdings zeigten Insulinsekretionsstudien keine Veränderungen der Insulinsekretion im pEGFPC1- $G\alpha_3$ C4AS Einzelzellklon C7.

Quantitative Westernblotanalysen mit spezifischen Phosphoserin-/Phosphothreonin-Antikörpern wurden durchgeführt, um die Phosphorylierungsmuster von Proteinen wie dem Calcineurin oder der

SNARE-Proteine in INS-1 Zellen nach Stimulation zu untersuchen. Zwei verschiedene spezifische Antikörper zeigten keine vergleichbaren Proteinmuster phosphorylierter Proteine in stimulierten INS-1 Zellen.

Da $G\alpha_i3$ reprimierte INS-1 Zellen keine Veränderung in der Insulinsekretion zeigen, kann der Schluss gezogen werden, dass $G\alpha_i3$ nicht an der Insulinsekretion beteiligt ist. Die Inhibition der Insulinsekretion in INS-1 Zellen ist PTX-sensitiv, $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ konnten jedoch in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Damit erscheint eine Involvierung der PTX-sensitiven $G\alpha$ -Untereinheit $G\alpha_o$ in die Vermittlung der Inhibition der Insulinsekretion wahrscheinlich, was aber in weiteren Studien untersucht werden muss.

1. Einleitung

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) ist eine weltweit verbreitete Krankheit, die sich durch einen Mangel oder eine reduzierte Wirkung des Hormons Insulin auszeichnet. In Amerika leiden nach neueren Angaben des Center for Disease Control 15.7 Millionen Menschen an DM, 6% der gesamten amerikanischen Bevölkerung. Jährlich werden bis zu 800.000 neue Fälle diagnostiziert. In Deutschland geht man von 5 Millionen Diabetes-Patienten aus, es wird jedoch angenommen, dass die Dunkelziffer weitaus höher liegt.

Es werden vier Formen des DM unterschieden (Typ I-IV): Der juvenile DM (Typ I) wird als Insulin abhängiger Diabetes Mellitus (Insulin dependent Diabetes mellitus, IDDM) bezeichnet. Bei dieser Form kommt es durch Autoimmunreaktionen, genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse zur Zerstörung der pankreatischen β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln und damit zu einer Unterversorgung des Körpers mit Insulin. Der Anteil des Typ I DM liegt zwischen 5 - 10%.

Beim adulten, Insulin unabhängigen Typ II DM (Non Insulin dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) kommt es sowohl zu einer verminderten Ausschüttung des Hormons als auch zu einer reduzierten Wirkung an den Insulinrezeptoren der Zielzellen in Muskel und Leber. Dieses Phänomen wird auch als Insulinresistenz bezeichnet ^(1, 2, 3, 4, 5). Der Typ II ist mit 90 - 95% die häufigste Krankheitsform des DM. Bei der verminderten Freisetzung des Insulins scheinen heterotrimere G-Proteine eine Rolle zu spielen ^(6, 7).

Der Typ III DM tritt nur während der Schwangerschaft auf (2 - 5%). Bei 30 - 40% dieser Frauen besteht jedoch das Risiko, dass diese später einen anderen DM-Typ entwickeln.

Typ IV DM, der nur bei 1 - 2% der DM-Patienten auftritt und damit sehr selten ist, kann durch falsche Ernährung, chirurgische Eingriffe, Drogen oder Krankheiten verursacht werden ⁽⁸⁾.

1.2. Das Hormon Insulin

Das Pankreas des Menschen besteht aus einem exokrinen, das Sekret produzierenden, und einem endokrinen, die Hormone synthetisierenden Teil. Letzterer wird durch die Langerhans'schen Inseln gebildet, die 1869 erstmals durch Paul Langerhans beschrieben wurden. Sie bestehen zu 60-70% aus β -Zellen (B-Zellen), die Insulin synthetisieren und speichern, zu ca. 20% aus Glukagon produzierenden α -Zellen (A-Zellen) und zu 10-15% aus δ -Zellen (D-Zellen), welche Somatostatin bilden.

Insulin, das in den β -Zellen produziert wird, besteht aus zwei Polypeptidketten A (21 Aminosäuren) und B (30 Aminosäuren), die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbundenen sind. Die Gesamtmolekülmasse des Proteins beträgt 6 kD.

Es geht aus den Vorstufen Präproinsulin und Proinsulin durch proteolytische Spaltung hervor und wird in den „Large Dense Core Vesikeln“ (LDCVs) gespeichert. Selbst bei einer

maximalen Stimulation der Hormonsekretion wird jedoch nur ein geringer Teil des gespeicherten Insulins aus den LDCVs sezerniert. Die Insulinsekretion wird nach der Nahrungsaufnahme durch einen Anstieg der Blutglukosekonzentration über 0.8 – 1 g/l stimuliert. Das in die Blutbahn sezernierte Insulin führt dann zu einer Stimulation der Aufnahme und Speicherung der Glukose in den Muskelzellen und im Fettgewebe und dadurch zur Senkung der Blutglukosekonzentration.

Bindet Insulin an den Rezeptor, so kommt es durch die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors sowohl zur Autophosphorylierung an Tyrosinseitenresten des Rezeptors als auch zur Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS1-IRS4). Die Phosphorylierung der IRS ermöglicht deren Bindung an die regulatorischen Untereinheit der Phosphoinositol 3-Kinase¹ (PI3-Kinase, PI3K) über SRC-Homologie Domänen (SH2-Adapter).

Nach der Aktivierung des PI₃-Kinase-Weges im Muskel- und Fettgewebe werden vermehrt Vesikel, die den Glukosetransporter (GLUT-4 Carrier) enthalten, zur Plasmamembran transloziert und eingebaut, wodurch die Aufnahme von Glukose in die Zelle ermöglicht wird. Durch die Aufnahme der Glukose und die Aktivierung des Glykogenstoffwechsels über die Enzyme Glucokinase, die Phosphofruktokinase und Glykogensynthetase wird Glukose als Glykogen gespeichert. Gleichzeitig inhibiert Insulin das Glykogen-abbauende Enzym (Glykogenphosphorylase) und damit die Glykogenolyse. Der Insulinrezeptor wird nach der Aktivierung und Autophosphorylierung internalisiert und das Insulin wird abgespalten. Anschließend wird der internalisierte Insulinrezeptor durch Proteintyrosinphosphatasen oder cytosolische Proteintyrosinphosphatasen dephosphoryliert. Danach erfolgt der Wiedereinbau in die Membran⁽⁹⁾.

Zu weiteren die Insulinsekretion regulierenden Hormonen zählen die Inkretine, zu denen das GLP-1 (Glukagon-like peptide) und das GIP (Glucose-dependent insulinotropic protein) gehört. Durch die Bindung dieser Hormone an ihre jeweiligen Rezeptoren wird die cAMP-Signalkaskade aktiviert, die durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA führt, die wiederum spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle stimuliert⁽¹⁰⁾. Außerdem wird die Insulinsekretion durch Somatostatin und Galanin reguliert. Die Bindung von Somatostatin und Galanin an ihre Rezeptoren resultiert in der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, die über die Inhibition der Adenylatzyklase die Insulinsekretion hemmen⁽¹¹⁾.

¹Durch die Aktivierung der PI3-Kinase phosphoryliert deren katalytische Untereinheit Phosphoinositide an der 3'-Position des Inositolringes oder Proteine an Serinseitenresten. Die PI3K aktiviert die PtdIns(3,4)P2/PtdIns(3,4,5)P3 abhängige Kinase 1 (PDK1), welche daraufhin die PKB, eine Serinkinase, aktiviert. PKB deaktiviert die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3), wodurch die Glykogensynthase und damit die Glykogensynthese aktiviert wird.

1.3. Regulation der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle

Die Sekretion aus pankreatischen β -Zellen wird gesteuert durch Nährstoffe wie Glukose und Aminosäuren sowie der Wirkung von Neurotransmittern und Hormonen und kann in proximale Effekte, die sich auf die Modulation von sekundären Botenstoffen (Second Messengern) auswirken, und in distale Effekte, welche den eigentlichen Exozytosemechanismus betreffen, unterteilt werden ⁽¹¹⁾.

1.3.1. Proximale Effekte der Insulinsekretion

1.3.1.1. Inhibition der Insulinsekretion über heterotrimere G-Proteine

Adrenalin stimuliert die α_2 -Adrenozeptoren ^(12, 13). Dadurch werden heterotrimere, inhibitorische G-Proteine, die Pertussis Toxin (PTX)-sensitiv² sind, aktiviert. Die Funktion heterotrimerer G-Proteine, die aus einer α -Untereinheit mit GTPase-Aktivität, einer β - und einer γ -Untereinheit bestehen und an der Membran assoziiert sind ⁽¹⁴⁾, besteht in der Weiterleitung, Verstärkung und Diversifizierung eines extrazellulären Signals z.B. eines Neurotransmitters oder Hormons an intrazelluläre Effektorsysteme wie die Adenylatzyklase (Adenyl cyclase, AC), die Guanylatzyklase (GC), die Phosphodiesterase (PDE) oder die Phospholipase C (PLC) ^(15, 16, 17, 18, 19, 20). Die Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine können zusätzlich die Aktivität von Ionenkanälen regulieren.

Die Effektorsysteme (AC, PDE, PLC und GC) wandeln dann das extrazelluläre Signal durch die Modulation von Second Messengern wie cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), Inositoltriphosphat (IP₃) oder Diacylglycerol (DAG) in ein intrazelluläres Signal um. Die Second Messenger leiten das Signal dann durch weitere Effektoren wie z.B. der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) oder der DAG-abhängigen Proteinkinase C (PKC) in die Zelle. Heterotrimere G-Proteine können jedoch auch direkte Effekte auf die Vesikelfusion vermitteln ⁽²¹⁾ oder die Zellteilung beeinflussen ⁽²²⁾.

1.3.1.1.1. Aktivierung heterotrimerer G-Proteine

Die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine erfolgt durch eine extrazelluläre Ligandenbindung z.B. eines Neurotransmitters oder Hormons an den Rezeptor. Dadurch wird die Affinität des GDP-G-Proteinkomplexes für Mg²⁺ erhöht, GDP dissoziiert ab und GTP bindet an die α -Untereinheit. Durch die Bindung kommt es zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die aktivierte α -Untereinheit und den dimeren β/γ -Komplex. Die α -Untereinheit aktiviert Effektoren wie die AC, die GC, die PLC β oder die PDE. Durch die Aktivierung dieser Effektoren wird die Konzentration intrazellulärer Second Messenger moduliert ^(23, 24). Die α -

² Pertussis Toxin (PTX) katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cysteinrestes der G α i/o-Untereinheit und hält die G α -Untereinheit, die GDP gebunden hat, in dieser inaktiven Form fest.

GTP-Untereinheit bleibt aktiv, bis das GTP zu GDP hydrolysiert wird. Die α -GDP-Untereinheit besitzt eine hohe Affinität für den β/γ -Komplex und verbindet sich mit diesem wieder zum GDP-gebundenen, inaktiven heterotrimeren G-Protein³ (Abbildung 1.1.).

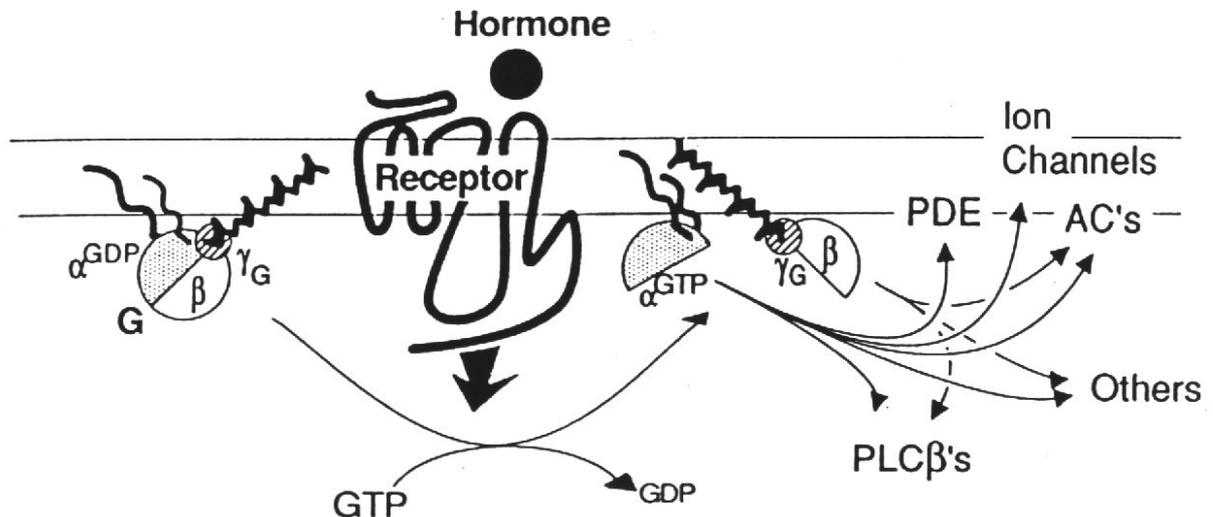


Abbildung 1.1.: Die G-Protein Signaltransduktionskaskade und deren Effektoren ⁽²⁵⁾
 GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, PDE: Phosphodiesterase, PLC β : Phospholipase C β , AC: Adenylatzyklase

1.3.1.1.2. G-Protein Untereinheiten als Signalmoleküle

Sowohl die monomere α -Untereinheit als auch der dimere β/γ -Komplex besitzen den Charakter von Signalmolekülen ^(26, 27, 28). Die β/γ -Heterodimere modulieren die Aktivität von Ionenkanälen und Effektoren wie z.B. manche Formen der PLC, der AC und Kaliumkanäle wie z.B. den einwärts gleichrichtenden (K^+ -Kanal inward rectifying, KIR) und den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal ^(25, 29). Zusätzlich wurden direkte Effekte des heterotrimeren β/γ -Komplexes sowohl auf spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Voltage dependent Ca^{2+} -Channels, VDCC) ⁽³⁰⁾ als auch auf G-Protein gekoppelte, einwärtsgleichrichtende K^+ -Kanäle (GIRK) nachgewiesen ⁽³¹⁾.

1.3.1.1.3. Klassifizierung der G-Protein Untereinheiten

Bisher sind bei den G-Proteinen 17 Gene, die für 21 verschiedene G-Protein α -Untereinheiten kodieren, gefunden worden. Durch alternatives Splicing kann dabei ein Gen für mehrere α -Untereinheiten kodieren ⁽³²⁾. Zusätzlich sind vier verschiedene β - und sechs γ -

³ Für die Entdeckung und Beschreibung heterotrimerer G-Proteine erhielten Gilman und Rodbell den Nobelpreis für Medizin oder Physik (Alfred Goodman Gilman und Martin Rodbell: „Entdeckung der Zellkommunikation und im speziellen der Entdeckung der G-Proteine“ (1994)).

Untereinheiten bekannt (14, 33). Die Interaktion der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten mit den β/γ -Untereinheiten ist dabei in vitro promiskuitiv.

Die Klassifizierung der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten in die verschiedenen Subtypen erfolgte ursprünglich aufgrund ihrer stimulatorischen oder inhibitorischen Wirkung auf Effektorsysteme wie die AC, GC, PLC und der PDE (Abbildung 1.2.). Die neue Unterteilung richtet sich nach der Primärsequenz der Subtypen (14, 33, 25).

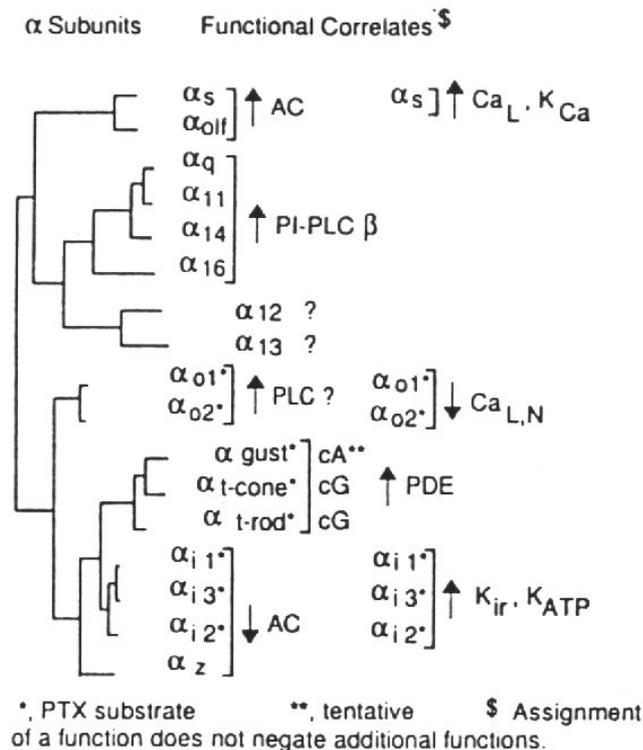


Abbildung 1.2.: Klassifizierung der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten (25)

Die Adenylatzyklase wird durch die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_{olf}$ stimuliert, inhibiert wird diese durch die PTX-sensitiven Untereinheiten $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_i3$ (zu den PTX-sensitiven G-Proteinen zählen $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_i3$ und $G\alpha_o$) (34) sowie durch $G\alpha_z$. Zusätzlich regulieren $G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, $G\alpha_i3$ die Kaliumkanäle GIRK und den K_{ATP} -Kanal (ATP-sensitive K^+ channel). Die PLC wird durch die beiden Untereinheiten $G\alpha_o1$ und $G\alpha_o2$ moduliert, die zudem L- und N-Typ- Ca^{2+} -Kanäle inhibieren. Die Regulation der Aktivität der PI-PLC erfolgt durch $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{16}$ (25).

1.3.1.1.4. Nachweis der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten

In Pankreas-Zellen wurden bisher die G-Proteine $G\alpha_i2$ in pankreatischen α -Zellen (35), $G_z\alpha$ (36), sowie $G\alpha_s$, $G\alpha_i1$, $G\alpha_i3$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_{olf}$ nachgewiesen (37, 36, 38, 39, 40, 41). Ebenso wurden im Jahr 1991 von Schmidt et al. PTX-sensitive G-Proteine und von Mazancourt et al.

im Jahr 1994 die $G\alpha i3$ -Untereinheit ^(42, 43) in der Insulinomazelllinie RINm5F nachgewiesen. Die G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, und $G\alpha i3$ wurden in Geweben der Ratte sowie im Menschen nachgewiesen ⁽⁴⁴⁾. Zusätzlich zu den drei inhibitorischen G-Proteinen $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, und $G\alpha i3$ wiesen Jones und Reed 1987 die Untereinheiten $G\alpha s$ und $G\alpha o$ im Neuroepithel des Riechorgans nach ⁽⁴⁵⁾. Die Expression trimerer G-Proteine wurde ebenfalls 1997 von Gasman et al. in chromaffinen Zellen nachgewiesen ⁽⁴⁶⁾. Sanchez-Margalet et al. wies 1999 die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha i1$ und $G\alpha i2$ in HTC-Zellen (Hepatoma Cells) aus Ratten nach ⁽⁴⁷⁾.

Obwohl die PTX-sensitiven α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, und $G\alpha i3$ ubiquitär vorkommen, wird deren Expression in β -Zellen kontrovers diskutiert: Die Existenz von $G\alpha i1$ und $G\alpha i3$ konnte von mehreren Forschern sowohl in β -Zellen als auch in verschiedenen β -Zelllinien nachgewiesen werden ^(39, 48, 37, 49). Anderen gelang der Nachweis der $G\alpha i1$ -Untereinheit in β -Zellen hingegen nicht ^(50, 51).

1.3.1.1.5. Inhibition der Insulinsekretion durch PTX-sensitive G-Proteine

Es ist nicht bekannt, welches der vier G-Proteine $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ oder $G\alpha o$ die inhibitorische Wirkung auf die Adenylatzyklase ausübt und damit die Insulinsekretion beeinflusst ⁽⁵²⁾. Mazancourt et al. zeigte im Jahr 1994, dass speziell $G\alpha i2$ und $G\alpha i3$ die Aktivität der Adenylatzyklase inhibieren ⁽⁴³⁾. In Fibroblasten scheint bei gleichzeitiger Aktivierung von $G\alpha i2$ und $G\alpha i3$ durch $\alpha 2$ -Adrenozeptoren $G\alpha i3$ jedoch nicht zur Inhibition der Adenylatzyklase beizutragen ⁽⁵³⁾.

Nach Aktivierung des $\alpha 2$ -Rezeptors durch Adrenalin verändert sich die Affinität der α -Untereinheit des PTX-sensitiven, inhibitorischen G-Proteins für GTP (Abbildung 1.3.1.). Nach Bindung des GTP dissoziiert die α -Untereinheit vom β/γ -Komplex ab und inhibiert die Aktivität der Adenylatzyklase (AC). Durch diese Inhibition kommt es zur Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration ⁽⁵⁴⁾, wodurch wahrscheinlich die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) reduziert wird. Gleichzeitig schließt der β/γ -Komplex spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ⁽³⁰⁾ und öffnet K-Kanäle ⁽⁵⁵⁾. Diese Regulation fördert die Repolarisation der Plasmamembran und senkt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, wodurch die Insulinsekretion gehemmt wird.

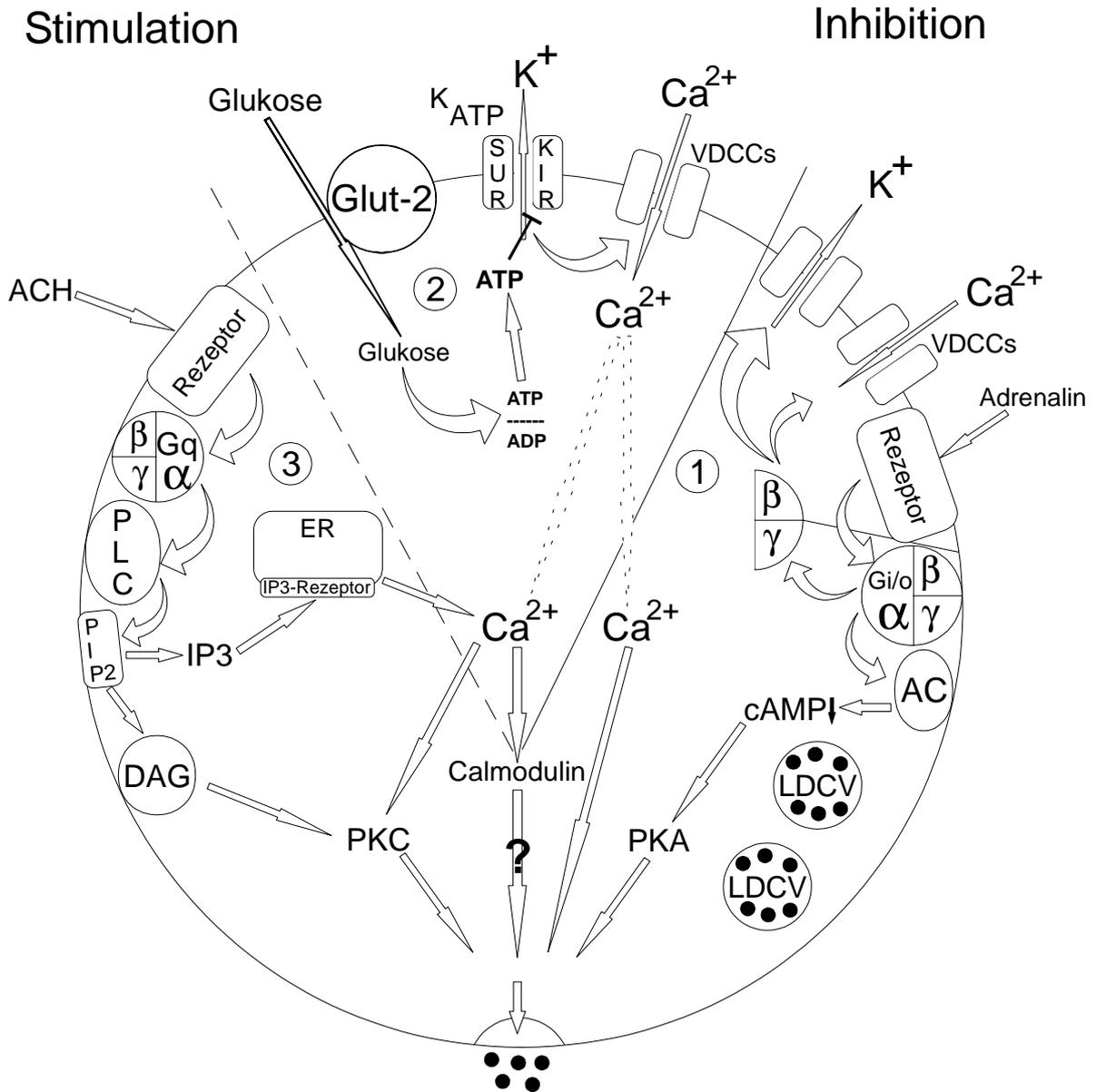


Abbildung 1.3: Mechanismen der Insulinsekretion

(1) Inhibition der Insulinsekretion über α_2 -Adrenozeptoren

(2) Stimulation der Insulinsekretion durch Glukose

(3) Stimulation der Insulinsekretion durch Acetylcholin

ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, SUR: Sulfonylharnstoffrezeptor (Sulphonyl Urea Receptor), K⁺ATP (ATP abhängiger K⁺-Kanal), VDCCs: Voltage Dependent Calcium Channels, spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, PLC: Phospholipase C β , PIP₂: Phosphatidylinositoldiphosphat, IP₃: Inositoltriphosphat, DAG: Diazylglyzerol, ER: Endoplasmatisches Retikulum, AC Adenylatzyklase, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat (cyclic AMP), PKA: cAMP abhängige Proteinkinase A, PKC: DAG-abhängige Proteinkinase C, LDCVs: Large Dense Core Vesicles (Speicher- und Sekretionsvesikel des Insulins), GLUT-2: Glukose-Transporter 2

1.3.1.2. Stimulation der Insulinsekretion durch Glukose

Glukose wird über das Glukose-Transportprotein, den Glut-2 Carrier, der einen erleichterten passiven Transport ermöglicht, in die Zelle aufgenommen. In der Zelle wird die Glukose über Glykolyse, Zitrat-Zyklus und Atmungskette in Gegenwart von O_2 zu Kohlendioxid (CO_2) und Wasser umgewandelt. Die dabei freigesetzte Energie wird zur Phosphorylierung von ADP zu ATP verwendet ⁽⁵⁶⁾.

Dabei verschiebt sich, wie angenommen wird, das zytosolische Konzentrationsverhältnis von ADP und ATP. Die gleichzeitige Verringerung der ADP-Konzentration und die Erhöhung der ATP-Konzentration führt zur Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle⁴ ^(57, 58, 59, 60, 61, 62), deren integraler Bestandteil der Sulfonylharnstoffrezeptor (Sulfonyl Urea Receptor, SUR) ist ⁽⁶³⁾. Da der K_{ATP} -Kanal für das Ruhemembranpotential verantwortlich ist, führt die Schließung dieser Kanäle zur Depolarisation der Zelle (Abbildung 1.3.2.). Die daraus resultierende Depolarisation ⁽⁶⁴⁾ öffnet eine Reihe spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle ^(65, 66, 67, 68). Es entstehen Ca^{2+} getragene Aktionspotentiale ⁽⁶⁹⁾.

Ca^{2+} aktiviert durch Bindung Enzyme und andere Proteine wie z.B. die Proteinkinase C (PKC) ⁽⁷⁰⁾ oder das Ca^{2+} -abhängige Calmodulin ⁽⁷¹⁾. Das Ca^{2+} -abhängige Calmodulin aktiviert nach Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen Enzyme wie z.B. die Ca^{2+} /CAM-abhängige Kinase (Ca^{2+} /CAM-Kinase). Die Substrate oder Effektoren initiieren nachfolgend die Insulinausschüttung aus den Large Dense Core Vesikeln (LDCVs). Diese Koppelung von Ca^{2+} -Einstrom und Insulinsekretion wird als Erregungs-Sekretionskoppelung („stimulus-secretion-coupling“) bezeichnet (Abbildung 1.3.2.) ^(72, 73). Ca^{2+} scheint noch zusätzlich neben den beschriebenen Effekten direkten Einfluss auf die Sekretion auszuüben.

1.3.1.3. Stimulation der Insulinsekretion durch Acetylcholin

Neben der Glukose induzierten Insulinfreisetzung kann diese auch auf dem Wege der Stimulation muskarinergere Rezeptoren erfolgen: Die Bindung von Acetylcholin (ACH) an seinen muskarinergen Rezeptor (Abbildung 1.3.3) aktiviert das heterotrimer G-Protein G_q , das seinerseits die PLC stimuliert ^(15, 74). PLC spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in die Second Messenger IP_3 und DAG ⁽⁷⁵⁾.

IP_3 bindet an Calciumkanäle des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und bewirkt so die Freisetzung von Ca^{2+} in das Cytosol. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an Calmodulin. Ca^{2+} und DAG aktivieren die PKC, eine Serin-/Threoninkinase.

Auf diesem Weg wird die Insulinsekretion über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninseitengruppen bisher unbekannter Substratproteine oder Enzyme stimuliert ^(76, 77, 78).

⁴ Diese bestehen aus je 4 Kir6.2 und SUR-Untereinheiten. Die Kir6.2 Untereinheit trägt die ATP, die SUR-Untereinheit die ADP-Bindungsstelle sowie die Bindungsregionen der Sulfonylharnstoffe ⁽⁵⁷⁾.

1.3.2. Distale Effekte der Insulinsekretion

Die durch die proximalen Effekte vermittelte Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration scheint zur Stimulation der Insulinsekretion alleine nicht auszureichen. Es wird vielmehr angenommen, dass die Insulinfreisetzung durch zusätzliche distale Effekte bestimmt wird. Untersuchungen an Neuronen lassen vermuten, dass auch die Insulinsekretion durch das Gleichgewicht von Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung mitbestimmt wird ^(76, 77). Ferner gibt es zahlreiche, von der neuronalen Transmitterfreisetzung abgeleitete Hinweise für eine Involvierung des SNARE-Komplexes in sekretorische Prozesse wie der Hormonfreisetzung aus β -Zellen ⁽⁷⁹⁾.

1.3.2.1. Die Proteinphosphatase 2B Calcineurin (PP2B)

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen modulieren durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung Proteine oder Enzyme. Zu den wichtigsten intrazellulär existierenden Serin-/Threoninproteinkinasen zählen die durch DAG und Ca^{2+} aktivierte PKC, die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (Ca^{2+} /CAM-Kinase II). Eine Phosphatase, die bei sekretorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, ist die Proteinphosphatase 2B (PP2B), das Calcineurin ^(35, 80, 81, 82).

Proteinphosphatasen vom Typ I werden nach ihrer Fähigkeit, die β - (PP1) oder die α -Untereinheit (PP2) der Phosphorylase-Kinase zu dephosphorylieren, klassifiziert. Typ II Proteinphosphatasen werden zusätzlich noch nach den für die Aktivierung erforderlichen divalenten Kationen unterschieden in PP2A, die in Abwesenheit divalenter Kationen aktiv ist, in PP2B (Calcineurin), deren Aktivität durch mikromolare Konzentrationen von Ca^{2+} und durch die Gegenwart von Calmodulin stimuliert wird, und PP2C, die für die Aktivierung Mg^{2+} -Ionen benötigt ^(83, 84). Die Aktivität der PP2B kann selektiv durch die Pharmaka Cyclosporin A (CsA), FK506 sowie durch Okadaic Acid (OA) inhibiert werden ⁽⁸⁵⁾.

Calcineurin besteht aus einer 19 kD großen regulatorischen B-Untereinheit, welche Ca^{2+} mit hoher Affinität bindet und einer 58 – 61 kD großen katalytischen A-Untereinheit. Die A-Untereinheit besitzt neben der katalytischen Domäne mehrere regulatorische Domänen wie z.B. die Bindungsstelle für die B-Untereinheit, die Ca^{2+} /Calmodulin-Bindedomäne (Seitenketten 391 - 414) und eine Phosphorylierungsstelle am Serinrest Ser⁴¹¹ ⁽⁸²⁾. Bei Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bindet Ca^{2+} an Calmodulin, welches nachfolgend Calcineurin aktiviert. Die Dephosphorylierung der Bindungsstelle wird durch die Bindung von Ca^{2+} /CAM verhindert ⁽⁸⁶⁾. Calcineurin bleibt dadurch im aktivierten Zustand und stimuliert die Sekretion über einen bisher unbekanntem Mechanismus.

Calcineurin wurde erstmals in neuronalen ⁽⁸⁷⁾, mittlerweile jedoch auch in vielen anderen Zellen oder Geweben nachgewiesen ^(88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95). Zusätzlich wurde es in verschiedenen Geweben zusammen mit Enzymen wie der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (Myosin Light Chain Kinase, MLCK) sowohl nukleär ^(96, 97, 98, 99) als auch mit verschiedenen

Komponenten des Cytoskeletts wie beispielsweise des τ -Proteins ⁽¹⁰⁰⁾, des Mikrotubuli assoziierten Proteins 2 (MAP2) ⁽¹⁰¹⁾, des Tubulins ⁽¹⁰²⁾ und des Dystrophins nachgewiesen. Calcineurin wurde ebenfalls in β -Zellen des Pankreas nachgewiesen ^(103, 95), wo ihm eine Rolle bei der Modulation der Insulinfreisetzung zugeschrieben wird.

Zu den bisher bekannten Substraten des Calcineurins zählen unter anderem der IP₃-Rezeptor, das Mikrotubuli assoziierte Protein 2 (MAP-2) und das in synaptischen Nervenendigungen vorkommende Dynamin ⁽⁸¹⁾. Diese Substrate werden durch Calcineurin dephosphoryliert und deren Aktivität so moduliert ⁽¹⁰⁴⁾. Es ist denkbar, dass Calcineurin, ähnlich wie beispielsweise die PP2A auf Ionenkanäle wirkt⁵ ⁽¹⁰⁵⁾ oder sich über die Dephosphorylierung der Proteine des SNARE-Komplexes direkt auf die Insulinsekretion auswirkt. Ein Hinweis dafür könnte die Assoziation des Calcineurins mit den Komponenten des Zytoskeletts sein.

Die Funktion des Calcineurins in sekretorischen Geweben ist umstritten: Murphy et al. zeigten 1996, dass die Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen durch die Aktivierung der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A moduliert werden kann. Calcineurin hingegen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Insulinsekretion. Dieser Befund wurde durch die über Cyclosporin A (CsA) vermittelte Hemmung der PP2B bestätigt ⁽⁸³⁾.

In Min6 Zellen dagegen, einer Glukose-sensitiven Maus-Insulinomazelllinie, konnte gezeigt werden, dass durch 3 μ M Cyclosporin A ^(106, 107, 108), eine maximale Steigerung der Insulinsekretion erzielt werden konnte. Die Steigerung der Insulinsekretion korrelierte mit der reduzierten Aktivität des Calcineurins ⁽¹⁰⁹⁾. Lester et al. wiesen 2001 nach, dass Calcineurin und die PKA die Insulinsekretion über reversible Phosphorylierungsreaktionen regulieren ⁽¹¹⁰⁾. In β -Zellen konnte durch die Aktivierung der PP2B die Exozytose inhibiert werden ⁽¹¹¹⁾. Da Calcineurin in vielen sekretorischen Geweben nachweisbar ist, ist es denkbar, dass es an der Steuerung der Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen in diesen Geweben beteiligt ist.

1.3.2.2. Der SNARE-Komplex

Die Proteine des SNARE-Komplexes wurden erstmals in neuronalen Synapsen entdeckt und dort mit der Neurotransmitterfreisetzung in Verbindung gebracht ⁽⁷⁹⁾. Mittlerweile wurden diese Proteine oder Isoformen, die den SNARE-Komplex bilden, in zahlreichen anderen Geweben nachgewiesen ⁽¹¹²⁾. Es wird angenommen, dass der Mechanismus über den Insulin aus den LDCVs der β -Zellen freigesetzt wird, dem der synaptischen Neurotransmitterfreisetzung ähnlich ist ⁽¹¹³⁾.

⁵ Davare et al. zeigten, dass die Proteinphosphatase 2A (PP2A) die Phosphorylierung der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (Klasse C) durch die cAMP-abhängige PKA antagonisiert und so diese Ionenkanäle moduliert ⁽¹⁰⁵⁾.

Die an der Vesikelfusion beteiligten Proteine werden als SNARE-Proteine bezeichnet (SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors) und je nach Lokalisation in vesikuläre v-SNAREs und in, an der Target-Membran (Plasmamembran) lokalisierte, t-SNAREs unterteilt (114, 115, 112). Zu den v-SNAREs zählen u.a. das Vesikel assoziierte Membranprotein (VAMP) und das Synaptobrevin. Zu den t-SNAREs gehören u.a. das Syntaxin und das Synaptosomen assoziierte Protein mit dem Molekulargewicht von 25 kDa (SNAP-25). In Insulin-haltigen Geweben wurde ein dem SNAP-25 zu 59% homologes Protein, das SNAP-23 nachgewiesen. Neben den t- und v-SNAREs existieren weitere für die Vesikelfusion notwendige, akzessorische Proteine⁶. Der Mechanismus der Vesikelfusion mit der Zellmembran läuft über die verschiedenen Stufen des Dockings, des Primings und der Fusion ab (116).

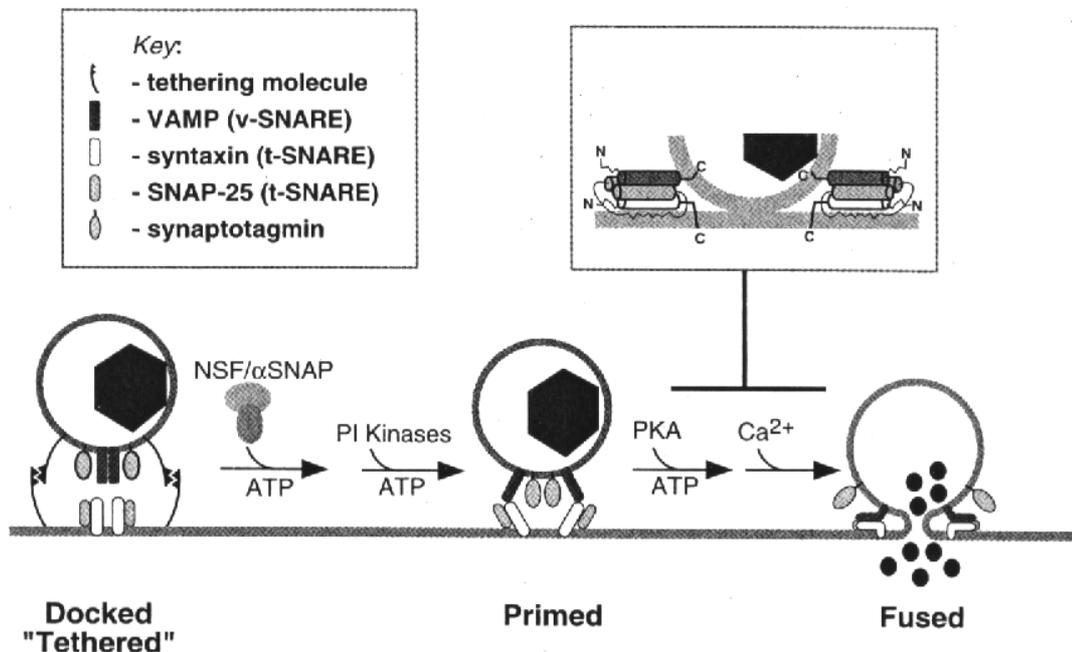


Abbildung 1.4.: Mechanismus der Sekretion. Die drei Stufen der Insulinfreisetzung aus β -Zellen: Der genaue Mechanismus des „Dockings“ ist bisher ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass in den Prozess des Tetherings („Anbindens“) verschiedene nicht zu den SNARE-Proteinen zählende Komponenten involviert sind. Der Priming-Mechanismus der Granula mit der Membran besteht aus den Stufen der NSF-ATP-Hydrolyse (über α -SNAP) und der Generierung von PtsIns(4,5)P₂ über die PI-Kinase. Es wird angenommen, dass die Bildung des trans-SNARE-Komplexes bestehend aus t-SNAREs und v-SNAREs über Synaptotagmin in Ca²⁺-abhängiger Weise vermittelt wird. Das organisierte Zusammenspiel der SNAREs bringt ausreichend Energie für den endgültigen Fusionsprozess der Membranen auf. VAMP: Vesikel assoziiertes Membranprotein, ATP: Adenosintriphosphat, NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion (NSF) protein, α -SNAP: α -Soluble NSF attachment Protein, SNAP-25: Synaptosomen assoziiertes Protein mit dem Molekulargewicht von 25 kD (modifiziert nach RA Easom (2000))

⁶ Zu diesen gehören das NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein), das α -SNAP, das Munc18c, die Rab3a, eine monomere GTPase (118) und das Synip. Diese zusätzlichen Proteine spielen bei der Initialisierung sowie bei der eigentlichen Fusion der Vesikel mit der Zellmembran eine Rolle, werden aber nicht direkt den SNARE-Proteinen (v-SNARE, t-SNARE) zugeordnet (119).

Der Fusionsprozess des Vesikels mit der Membran beginnt mit der Bildung eines stabilen, heterodimeren Komplexes, bestehend aus dem vesikulären VAMP-2 und dem Syntaxin in der Zellmembran. Dadurch wird der Vesikel in Kontakt mit der Membran gebracht. Anschließend lagert sich das SNAP-25 an diesen Komplex an, bindet das NSF und löst auf noch unbekanntem Wege die Membranfusion aus (Abbildung 1.4.). Die Proteine α -SNAP und NSF scheinen bei der Vesikelfusion eher regulatorische oder modulatorische Wirkung auf den SNARE-Komplex zu haben ⁽¹¹⁷⁾.

Da mittlerweile viele der SNARE- oder der akzessorischen Proteine auch in β -Zellen nachgewiesen wurden, wird angenommen, dass die Insulinfreisetzung aus den LDCVs über einen ähnlichen Mechanismus abläuft.

1.4. Vergleich der pankreatischen β -Zelle mit der Insulinomazelllinie INS-1

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl verschiedener Insulin-sezernierender Zelllinien wie die der RINm5F ⁽¹²⁰⁾, HIT-T15, Min6 ^(121, 122) und INS-1 etabliert worden ⁽¹²³⁾.

Für die Durchführung der Experimente wurden INS-1 Zellen ausgewählt, einer von pankreatischen β -Zellen aus Ratten abgeleitete Insulinomazelllinie, die verglichen mit anderen permanenten Zelllinien eine Vielzahl β -zellspezifischer Eigenschaften besitzt:

INS-1 Zellen weisen eine für die β -Zelle typische zelluläre Morphologie auf. Die Protein-Precursor Proinsulin I und II konnten ebenso nachgewiesen werden, wie eine Immunreaktivität für Insulin; andere pankreatische Hormone wie Glukagon oder Somatostatin waren nicht detektierbar. Der Insulingehalt der INS-1 Zelle liegt bei $8 \mu\text{g}/10^6$ Zellen, beträgt ca. 20% des Gehaltes nativer β -Zellen und liegt damit weit über dem der anderen permanenten Zelllinien RINm5F, HIT-T15 und Min6. Die Stimulation der INS-1 Zellen mit Glukose in physiologischen Bereichen von 1 mM bis 20 mM führt zur Depolarisation der Zelle und geht mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einher. INS-1 Zellen weisen in Abhängigkeit von 2-Mercaptoethanol ein kontinuierliches Wachstum mit einer langsamen Zellproliferation bei einer Verdoppelung der Zellzahl innerhalb von 48 h auf. Die oben beschriebenen strukturellen und funktionellen Eigenschaften sind über einen Zeitraum von 80 Passagen (2 Jahre) stabil ⁽¹²³⁾.

1.5. Zielsetzung der Doktorarbeit

Um die Mechanismen zu verstehen, die zur Hemmung der Insulinsekretion führen, ist das Verständnis der stimulatorischen Signalwege notwendig. Es ist bekannt, dass bei Stimulation α_2 -adrenerger Rezeptoren die Hemmung der Insulinsekretion über inhibitorische PTX-sensitive G-Proteine erfolgt. Welches spezielle G-Protein jedoch die Inhibition des Effektors, der Adenylatzyklase, vermittelt ist nicht bekannt. Eine Involvierung heterotrimerer G-Proteine bei der Ausbildung von DM ist sowohl für den Insulin-abhängigen Typ I ⁽¹²⁴⁾ als auch für den

Insulin-unabhängigen Typ II DM ^(6, 7) unter anderem auch in Tiermodellen nachgewiesen worden.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die durch die der PTX-sensitiven inhibitorischen G-Proteine $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ vermittelte Inhibition der Insulinsekretion zu untersuchen. Dazu sollen die G-Proteine $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, und $G\alpha_{i3}$ in INS-1 Zellen nachgewiesen und anschließend spezifisch und unabhängig voneinander mit Hilfe der Antisense-Technik gezielt reprimiert werden.

1.5.1. Nachweis der $G\alpha_i/o$ Untereinheiten im Modellsystem INS-1

Zu diesem Zweck sollen die verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ in INS-1 Zellen mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR), über Immuncytochemie und Westernblotting auf der Expressions- und der Translations bzw. Proteinebene nachgewiesen werden.

1.5.2. Differenzierte Manipulation der $G\alpha_i/o$ durch selektive Repression

Die selektive Repression der G-Proteine $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ soll über Einbringung von Antisense-Fragmenten in die Insulinomazelllinie INS-1 erfolgen. Deshalb soll eine Methodik etabliert werden, mit der INS-1 Zellen sowohl transient als auch stabil transfiziert werden können. Zur besseren Identifizierung der transient und stabil transfizierten INS-1 Zellen sollen die $G\alpha$ -Antisense-Fragmente an das Reporterogen EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) gekoppelt werden, sodass eine Fusions-mRNA zur Repression des Targetproteins bzw. ein fluoreszierendes EGFP-Antisense-Protein zur Identifizierung positiver INS-1 Zellklone entsteht. Die Selektion stabil transfizierter INS-1 Zellklone soll über die Einbringung einer Antibiotikaresistenz (Geneticin, G418) gewährleistet werden.

1.5.3. Vergleich und Charakterisierung transienter und stabiler Repression

Die Repressionen der G-Protein α -Untereinheiten sollen in den erhaltenen INS-1 Misch- bzw. Einzelzellklonen mittels Westernblotting, Insulinsekretionsstudien (Radioimmunoassay) und anschließenden funktionellen Analysen über Patch-Clamp-Experimente untersucht werden.

1.5.4. Analyse der Calcineurin-Phosphorylierung in INS-1 Zellen

Zahlreiche Hinweise deuten auf die Involvierung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen speziell der Proteinphosphatase 2B Calcineurin (PP2B) in die Sekretion von Transmittern und Hormonen ^(35, 80). Über die Substrate intrazellulärer Proteinkinasen wie der PKA, der Ca^{2+} /CAM-abhängigen Proteinkinase oder der PKC ist ebensowenig bekannt wie über die Substrate intrazellulärer Proteinphosphatasen wie der PP2A oder PP2B ⁽¹¹⁶⁾. Um die Calcineurin-Aktivität in Insulin sezernierenden Zellen zu untersuchen, soll das Serin- und

Threonin-Phosphorylierungsmuster von INS-1 Zellen nach maximaler Stimulation und nach Hemmung des Calcineurins durch Deltamethrin analysiert werden. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die an der Exozytose beteiligten Proteine des SNARE-Komplexes zu den Substraten des Calcineurins gehören und diese somit nach Aktivierung Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen. Zur Durchführung dieser Experimente wird das Proteinphosphorylierungsmuster stimulierter INS-1 Zellen im Westernblot mittels spezifischer gegen Phosphoserin- und Phosphothreoninreste gerichteter Antikörper analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen und Lösungen

2.1.1. Zellkultur

Substanzen/Geräte (Hersteller)

- 10 cm Schalen (Falcon/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- BioRad Gene Pulser Cuvette, Elektroporationsküvetten, 0.4 cm (BioRad, München)
- DMSO, Dimethylsulfoxid (Sigma, Deisenhofen)
- FCS, Fetal Calf Serum, Hitzeinaktivierung bei 56°C für 2 h (Biochrom, Berlin)
- Gene Pulser (BioRad, München)
- Geneticin G418 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- Gewebekulturflaschen, 250ml, 75 cm² (Greiner, Langenthal)
- HEPES (Sigma, Deisenhofen)
- Kryoröhrchen, 1.8ml (Nunc, Wiesbaden-Biebrich)
- L-Glutamin (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)
- Multiwellplatten 24er (Falcon/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- Multiwellplatten 48er (Falcon/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- Multiwellplatten 96er (Falcon/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- Pen-Strep, Penicilin/Streptomycin (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- RPMI 1640 w/o L-Glutamin (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- Trypsin/EDTA (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)

Lösungen

- EM (Einfriermedium): 70 µl DMSO / 1 ml VM
- G418 (Geneticin): 1 gr Geneticin / 10ml PBS, Endkonzentration 250-300 µg/ml VM
- HEPES: 23.83 gr HEPES ad 100 ml A. bidest, pH 7.4
- Kontrolllösung I: 5 mM EGTA, 0.5 mM Glukose, 0.1% DMSO
- Kontrolllösung II: 0.1 µM Deltamethrin, 5 mM EGTA, 0.5 mM Glukose, 0.1% DMSO
- PBS (Phosphat gepufferte Saline): NaCl (8 gr), Na₂HPO₄ x 2 H₂O (1.44 gr), KH₂PO₄ (0.2 gr) ad 500 ml, pH 7.4
- Trypsin: 1:20 in PBS
- VM (Vollmedium): RPMI 1640, FCS 100 ml/l, Penicilin 100.000 U/l, Streptomycin 100 mg/l, L-Glutamin 10 ml/l, HEPES 10 mmol/l, 2-Mercaptoethanol 50 µmol/l, Natriumpyruvat 1 mmol/l

2.1.2. Molekularbiologie

Substanzen/Geräte (Hersteller)

- Agar-Agar (Roth, Karlsruhe)
- Age I (Stratagene Europe, Amsterdam)
- Ampicilin Natriumsalz (Serva, Heidelberg)
- Asel/Vspl (Stratagene Europe, Amsterdam)
- ATAQ250 + Puffer I (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BamH I (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Bgl II (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Borsäure für die Molekularbiologie (Merck, Darmstadt)
- BspE I (Stratagene Europe, Amsterdam)
- EcoR I (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- EcoRV (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)
- Gelextraktionskit 50 (Qiagen, Hilden)
- Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm (BioRad, München)
- Hefeextrakt, Select Yeast Extract (Sigma, Deisenhofen)
- Hind III (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Inkubator für Bakterienzucht, Incubator Shaker Model G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc, New Jersey, USA)
- IPTG, Isopropylthiogalactosid (Boehringer, Mannheim)

- Kanamycin sulfate (Amersham Life Science, Freiburg)
- Lambda Hind III – Marker (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- Maxi Präp Kit: Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- Metaphor-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)
- Mlu I (Promega, Mannheim)
- NaCl (Roth, Karlsruhe)
- Nsi I (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- pCR2.1TOPO-Vektor (Invitrogen, Heidelberg)
- pEGFPC1-Vektor (Clontech/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- Pepton aus Casein (Roth, Karlsruhe)
- Puffer PB, QIAquick PCR - Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Pvu II (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Qualex-Gold Agarose (AGS, Berlin)
- Sac I (Promega, Mannheim)
- Sma I New England Biolabs NEB, Frankfurt
- Standardmarker „100 bp Ladder“ (Gibco Life Technologies, Karlsruhe)
- SW55 Rotor (Beckmann, München)
- T-4 Ligase, DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim)
- Tischzentrifuge Biofuge Pico (Heraeus Instruments)
- UV-Bank: Herolab™ UV-T 28M
- Wasserbad C1/B3 (Haake)
- Wasserbad C1/W13 (Haake)
- Xba I (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- X-Gal, 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (Boehringer, Mannheim)
- Xho I (New England Biolabs NEB, Frankfurt)
- Zentrifuge 1: J2HS, Rotor JA20, Rotor JA14 (Beckmann, München)
- Zentrifuge 2: Megafuge 1.0R (Heraeus, Osterrode)

Lösungen

- Ampicilin, St.-Lsg.: 50 mg/ml H₂O, final: 80 µl Ampicilin ad 100 ml LB-Medium
- Einfriermedium für Bakterienklone: 32.5 ml Glycerol + 1.25 M Tris pH 8.0 + 5 ml MgSO₄ (1M) + 11.25 ml A.bidest
- Ethanol, 100% -20°C
- Ethanol, 70% -20°C
- H-Puffer (Promega, Mannheim)
- IPTG: 0.1 M, 40 µl IPTG/Agarplatte
- Isopropanol, 100%
- Kanamycin, St.-Lsg.: 10 mg/ml H₂O, final: 300 µl Kanamycin ad 100 ml LB-Medium
- Lambda-Hind III-Marker: 3 µl Loading Puffer + 4 µl λ Hind III – Marker + 3 µl A.bidest
- LB-Agarplatten: Agar-Agar (15 gr) mit LB-Medium ad 1 L, Antibiotikazusatz: 300 µl Kanamycin + 80 µl Ampicilin ad 100 ml Agar/LB
- LB-Medium, flüssig (1 L): Pepton aus Casein (10 gr), Hefeextrakt (5 gr), NaCl (5 gr) mit bidest ad 1L
- MOPS: 4-Morpholinopropansulfonsäure (20mM)
- Natriumacetat: 136 gr ad 500ml A. bidest, pH 4.7
- Natriumphosphat: 69 g/L NaH₂PO₄ in A. bidest, pH 7.0
- P1: 100 mg/l RNase, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.8, Resuspension Buffer aus dem Plasmid Maxi Kit 25 (Qiagen, Hilden)
- P2: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS, Lysis Buffer aus dem Plasmid Maxi Kit 25 (Qiagen, Hilden)
- P3 (3 M KAc, pH 5.5), Neutralization Buffer aus dem Plasmid Maxi Kit 25 (Qiagen, Hilden)
- TBE (10x): TRIS (108 gr) + Borsäure (55 gr) + EDTA (9.3 gr) mit A.bidest ad 1L, pH 8.3
- TES: 100 µl (1.0 M) TRIS-HCl, pH 8.1 + 250 µl (0.2 M) EDTA, pH 7.4 + 100µl 10% SDS mit A. bidest ad 10ml
- X-Gal: 20 mg/ml, 40 µl X-Gal/Agarplatte

2.1.3. Proteinbiochemie

Substanzen/Materialien (Hersteller)

- Acrylamidlösung, Acrylamid (AA) N,N'-Methylenbisacrylamid (BA) (29:1) (Biometra, Göttingen)
- Amidoschwarz 10B (Merck, Darmstadt)
- APS, Ammoniumpersulfat (Biomol, Hamburg)
- BioRad Model 200/2.0 Power Supply (BioRad, München)
- BioRad Model 250/2.5 Power Supply (BioRad, München)
- BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V (Serva, Heidelberg)
- Cellulose-Acetat (Sartorius AG, Göttingen)
- DMSO, Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt)
- Elektrophoresesystem: BIO-RADmini 2-D Cell (BioRad, München)
- Glycin (Sigma, Deisenhofen)
- G-Protein-Antikörper (Kaninchen IgG, polyclonal): Antikörperset SA-182 gegen $G\alpha$, $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$, $G\alpha 0$ und $G\alpha S$ (Biomol, Hamburg)
- G-Protein-Antikörper (Kaninchen IgG, polyclonal): $G\alpha i1$ (I-20, sc-391), $G\alpha i2$ (T-19, sc-7276), $G\alpha i3$ (C-10, sc-262), $G\alpha 0$ (K-20, sc-387), $G\alpha S$ (K-20, sc-823) (SCBT Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Lauryl sulfate (Sigma, Deisenhofen)
- NaCl (Roth, Karlsruhe)
- Nitrocellulose Membran: Hybond-ECL, 0.45 μ m (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- PBS (Phosphat gepufferte Saline): NaCl (8 gr) + $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ (1.44 gr) + KH_2PO_4 (0.2 gr) ad 500 ml, pH 7.4
- Phosphoserin-Antikörper (Maus IgM, monoclonal): Klon 4A3 und 1C8 (Biomol, Hamburg)
- Ponceau S (Serva, Heidelberg)
- Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete mini (Roche, Mannheim)
- SDS6H: 29 kDa (Karboanhydrase, Rindererythrozyten); 45 kDa Albumin, Ei); 66 kDa (Albumin, Rind); 97.4 kDa (Phosphorylase b, Kaninchenmuskel); 116 kDa (β -Galactosidase, E.coli); 205 kDa (Myosin, Kaninchenmuskel) (Sigma, Deisenhofen)
- Sekundäntikörper: AffiniPure Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-konjugiert (Dianova/Jackson Immuno Research, Hamburg)
- Sekundäntikörper: Anti-Maus-IgM (μ Chain specific), HRP-gekoppelt (Sigma, Deisenhofen)
- TCA, Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
- TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Biomol, Hamburg)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)
- TRIS-HCl (Roth, Karlsruhe)
- Tween-20 (Roth, Karlsruhe)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Whatmanfilter (Schleicher & Schüll, Dassel)

Lösungen

- AGFA Developer G135 A
- AGFA Rapid Fixierer G354
- APS: 10% (w/v) in A. bidest
- Bromphenolblau: 0.1%ig (w/v) in A. bidest
- ECL Western Blotting Detection Regents (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Laufpuffer (5x): TRIS (15 gr)+ Glycin (72 gr) ad 500 ml mit A. bidest. + 0.1% (w/v) SDS
- Neuhoff-Entfärber: Methanol: Essigsäure, 9 : 1
- Neuhoff-Färbelösung: Amidoschwarz 0.5% (w/v) in Methanol : Essigsäure, 9 : 1
- Ponceau S-Färbelösung: 0.2 g Ponceau S in 100 ml 3% (w/v) TCA
- SB 1x (Sample Buffer 1x): 1 ml Glycerin (1 ml), 100 μ l β -Mercaptoethanol + SDS (0.3 gr) + 5 M TRIS (1.25 ml), pH 6.8, mit A. bidest ad 10ml

- SB 3x (Sample Buffer): 3 ml Glycerin, 300 µl β-Mercaptoethanol + SDS (0.9 gr), 0.5 M TRIS (3.75 ml), pH 6.8, mit A. bidest ad 10ml
- SDS: 0.1% (w/v) in A. bidest
- SDS: 10% (w/v) in A. bidest
- SFP (Subzellulärer Fraktionierungspuffer): 10 mM TRIS/HCl, pH 7.5 + 5 mM EDTA) + 1Tablette Proteaseinhibitor Cocktail/10 ml SFP
- TBST (Tris gepufferte Saline mit Tween): 1.2 gr TRIS (10 mM) + 8.76 gr NaCl (150 mM) + 5.0 ml Tween-20 (0.5%) in 1L A. bidest, pH 7.3
- TCA (w/v): 3 gr Trichloressigsäure/100 ml A. bidest
- Transferpuffer mit SDS (Schäfer-Nielsen): 5,82 g TRIS (48 mM) + 2,93 g Glycin (39 mM) + 200 ml Methanol ad 1 L A. bidest., pH 9.2 + 1% (w/v) SDS
- Transferpuffer ohne SDS (Schäfer-Nielsen): 5,82 g TRIS (48 mM) + 2,93 g Glycin (39 mM) + 200 ml Methanol ad 1 L A. bidest., pH 9.2
- TRIS-Puffer, 0.5 M, pH 6.8
- TRIS-Puffer, 1.5 M, pH 8.8

2.1.4. Immuncytochemie

Substanzen/Materialien (Hersteller)

- BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V (Sigma, Deisenhofen)
- Entellan (Merck, Darmstadt)
- G-Protein-Antikörper (Kaninchen IgG, polyclonal): G α i1 (I-20, sc-391), G α i2 (T-19, sc-7276), G α i3 (C-10, sc-262), G α 0 (K-20, sc-387), G α S (K-20, sc-823) (SCBT Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- Multiwellplatten 6-well (Falcon/Becton Dickinson BD, Heidelberg)
- NGS, Normal Goat Serum (Camon)
- PFA (Paraformaldehyd) (Merck, Darmstadt)
- Poly-L-Ornithin-Lösung (Sigma, Deisenhofen)
- Sekundäntikörper: Affinity purified Anti-rabbit IgG, Cy3-konjugiert (Rockland)
- Xylol (Merck, Darmstadt)

Lösungen:

- NGS (3%): 375 µl NGS + 12.5 ml BSA (0.8% in TBS)
- PFA: 4 gr PFA in 50 ml A.bidest H₂O auf 60°C erwärmen, trübe Lösung mit 1-2 Tropfen 1M NaOH versetzen + 50 ml 0.2 M PBS, pH auf 7.4 einstellen, filtrieren
- TBS 50 mM: 6.057 gr TRIS in 20 ml A. bidest + 6.766 gr NaCl, pH 7.6 einstellen, mit A. bidest auf 1 L auffüllen.
- Triton X100 (0.5 M Ammoniumchlorid + 0.25% TritonX in TBS): 0.59 gr Ammoniumchlorid + 50 µl Triton X100 + 20 ml TBS

2.2. Zellkultur

2.2.1. Auftauen der Zellen

INS-1 Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff im Wasserbad bei 37°C langsam aufgetaut, der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Vollmedium (VM) resuspendiert und in Greiner-Kulturflaschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste des toxischen DMSO zu entfernen. Anschließend erfolgte alle drei Tage der Medienwechsel.

2.2.2. Zellpassagierung

INS-1 Zellen wurden nach Absaugen des Mediums 1x mit sterilem PBS gewaschen und mit 5 ml 37°C warmem Trypsin versetzt. Die Trypsinreaktion wurde nach 5 min bei 37°C mit 20 ml 4°C kaltem VM gestoppt, die Zellen wurden vom Kulturflaschenboden abgespült, in ein 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 20 ml VM resuspendiert und mit Hilfe des Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) gezählt. Danach wurden 5 Millionen Zellen pro Kulturflasche ausplattiert, mit 15 ml VM versetzt und bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Sobald der Zellrasen subkonfluent gewachsen war, wurden die Zellen erneut passagiert. Ausgehend von einer ausgesäten Zellzahl von 5 Millionen Zellen betrug die Zellzahl nach einwöchigem Wachstum ca. 40 Millionen Zellen.

2.2.3. Kryokonservierung

Als Kryokonservierung bezeichnet man die Lagerung von Zellen in einem definierten Einfriermedium (70 µl DMSO/1 ml VM) bei -180°C in flüssigem Stickstoff. Die Sicherung von Zelllinien einer niedrigeren Zellpassage mittels der Kryokonservierung wird durchgeführt, um für den Fall der Alterung der Zellen und den damit häufig verbundenen Verlust der ursprünglichen physiologischen Funktionen sowie dem Verlust der Zelllinien durch Kontaminationen vorzubeugen und sofort Zellen mit niedriger Passagenzahl zur erneuten Aufzucht verfügbar zu haben.

INS-1 Zellen wurden trypsinisiert und mit Hilfe des Hämozytometers gezählt. 10 Millionen INS-1 Zellen wurden für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einstündiger Sedimentation der Zellen bei 4°C wurden diese nach einer weiteren Lagerung bei -80°C über Nacht anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.4. Stimulation von INS-1 Zellen zur Analyse der Proteinphosphorylierung

Die Analyse der Calcineurinphosphorylierung erfolgte nach Stimulation der INS-1 Zellen mit verschiedenen die Insulinsekretion stimulierenden oder inhibierenden Agonisten bzw. Antagonisten. Eine Millionen INS-1 Zellen wurden auf 3 cm Zellkulturschalen ausplattiert und bis zum subkonfluenten Wachstum kultiviert. Die Vorinkubation der Zellen wurde mit einer 0.5 mM Glukoselösung, die 0.5% Rinderserumalbumin enthielt (BSA), durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte eine basale Stimulation mit einer 0.5 mM Kontrollglukoselösung ohne BSA für 30 min bei 37°C. Die INS-1 Zellen wurden nach der basalen Stimulation mit verschiedenen, die Insulinsekretion modulierenden Substanzen behandelt. Zu den applizierten Substanzen gehörten neben Kontrolllösungen verschiedene Stimulationslösungen:

Zu den Kontrolllösungen zählt eine EGTA enthaltende Kontrolllösung (5 mM EGTA, 0.5 mM Glukose, 0.1% DMSO) und eine 0.1 µM Deltamethrin (DM) enthaltende Kontrolllösung (5 mM EGTA, 0.5 mM Glukose, 0.1% DMSO). EGTA als Chelator reduziert die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und inhibiert so den Glukose bedingten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Zusätzlich wird die Interaktion des Ca^{2+} mit Calmodulin durch die Chelierung des Ca^{2+} reduziert, wodurch die Interaktion mit der Proteinphosphatase 2B Calcineurin (PP2B) verhindert wird. Deltamethrin als Typ II-Pyrethroid inhibiert die Proteinphosphatase Calcineurin.

Stimulationslösung 1 enthielt neben einer 16.7 mM Glukosekonzentration Forskolin (5 µmol/l) und Tolbutamid (100 µmol/l). Forskolin aktiviert direkt die Adenylatzyklase und stimuliert so über die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration über die PKA die Insulinsekretion. Das Sulfonylharnstoffderivat Tolbutamid bindet an den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR), der ein integraler Bestandteil des ATP-abhängigen Kaliumkanal ist, und schließt diesen. Dadurch kommt es zur Depolarisation der Membran, wodurch spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle geöffnet werden, die wiederum durch den Ca^{2+} -Einstrom die Insulinsekretion stimulieren.

In Stimulationslösung 2 war Deltamethrin in 0.1 µM Konzentration enthalten, die Glukosekonzentration entsprach der basalen Glukosekonzentration von 0.5 mM. Durch das Deltamethrin sollte untersucht werden, ob bei basaler Stimulation der INS-1 Zellen durch Glukose eine durch Deltamethrin vermittelte Veränderung der Serin-/ Threoninphosphorylierung des Calcineurins oder anderer Proteine zu verzeichnen ist.

Für jeden Ansatz wurde je eine INS-1 Kulturschale mit 3 ml der verschiedenen Kontroll- bzw. Stimulationslösungen für 30 sec bis 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubation auf Eis aufbewahrt. Die Inkubationslösung wurde abgesaugt, die Proben zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 1x SB versetzt. Danach wurden die abgenommenen INS-1 Zellen für 2 min bei 100°C im Wasserbad gekocht, die Zellen so aufgeschlossen und nach Durchführung der Neuhoff-

Proteinbestimmung für die anschließende Proteinanalyse im Westernblot bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5. Zellkultur genetisch veränderter INS-1 Zellen

INS-1 Zellen wurden mittels Elektroporation genetisch modifiziert. Die verwendeten Expressionsvektoren ermöglichten die Selektion der transfizierten von untransfizierten Zellen mit Hilfe verschiedener Mechanismen: Bei der Transfektion eines Vektors, der ein Fusionsprotein bzw. eine Fusions-mRNA bestehend aus EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) und einem downstream vor das Stopkodon des EGFP ligiertes PCR-Produkt enthielt, konnten 2-3 Tage nach der Elektroporation anhand der EGFP-Fluoreszenz die transfizierten von den untransfizierten Zellen unterschieden werden. Die Expression des EGFP und die damit verbundene Fluoreszenz der positiven, transfizierten Klone diente bei diesen Transfektionen als Marker. Wurden Zellen mit einem Vektor transfiziert, der anstelle des EGFP-Gens eine Antibiotikaresistenz (Geneticin G418) enthielt, so war die Selektion der positiven, transfizierten von den negativen untransfizierten Zellen nur über die Antibiotikaresistenz möglich. Bei Transfektionen von Vektoren, die sowohl das EGFP-Gen als auch eine Antibiotikaresistenz enthalten, können transfizierte Zellen sowohl über die Fluoreszenz identifiziert als auch über die Antibiotikaresistenz selektioniert werden.

Sowohl bei transient transfizierten Mischklonen als auch bei den stabil transfizierten Einzelzellklonen wurde der Vektor in das zelluläre Genom integriert. Bei Einzelzellklonen wurden die transfizierten Zellen jedoch aktiv (G418) selektioniert, wohingegen bei transient transfizierten Mischklonen keine G418-Selektion durchgeführt wurde. Die Transfektionsrate der transfizierten Zellen betrug bei transienten Transfektionen 30%. Bei der stabilen Transfektion werden die transfizierten Zellen selektioniert, bei der transienten Transfektion gehen die Zellen aufgrund der nicht durchgeführten Selektion bei der Zellpassage verloren oder werden möglicherweise aufgrund der höheren Zellproliferationsrate von untransfizierten Zellen überwachsen.

2.2.6. Transfektion von INS-1 Zellen mittels Elektroporation

Zur Transfektion von Mammaliazellen gibt es neben der Methode der chemischen Transfektion, zu der die Verwendung von DEAE-Dextran sowie die Kalziumphosphat - Transfektion zählt, und der biologischen Transfektion, bei der die Zellen z.B. durch die Verwendung von Lipofectin/Lipofectamin transfiziert werden, die Möglichkeit Zellen mittels der physikalischen Transfektion, mittels der Elektroporation ^(125, 126) zu transfizieren. Bei der Elektroporation werden die zu transfizierenden Zellen zusammen mit der einzubringenden DNA in PBS oder einem alternativen Elektroporationsmedium (z.B. FCS freies Vollmedium) einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt, wodurch es zur Bildung von Membranporen kommt, durch die die DNA in die Zellen gelangt. Die Poren verschließen sich nach einer

Dauer von einigen Sekunden bis wenigen Minuten wieder, die DNA ist von der Zelle aufgenommen worden.

Auch wenn bei der Transfektion durch Elektroporation im Vergleich zu den anderen Transfektionstechniken eine große Menge an DNA benötigt wird (bis zu 50 µg bei der Elektroporation, 1 - 10 µg bei anderen Transfektionsmethoden), so hat die Elektroporation den Vorteil, dass sie schneller und verglichen mit anderen Transfektionsmethoden effizienter durchgeführt werden kann und gleichzeitig eine höhere Transfektionsrate erzielt wird.

Nachdem INS-1 Zellen trypsiniert worden waren, wurden sie mittels der Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) gezählt, 5 Millionen Zellen wurden in 500 µl EP (Elektroporationsmedium: FCS freies Vollmedium) aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 250 V, 960 µF mit einem Puls elektroporiert. Die Elektroporationsdauer betrug zwischen 25 und 35 Millisekunden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 5 min auf Eis gelagert und dann auf 10 cm Schalen ausplattiert. Nach 16 Stunden wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um Zelldebris und überschüssige DNA zu entfernen. Die Klone wurden anschließend entweder als transient transfizierte Mischklone mittels elektrophysiologischer Messungen, mit Hilfe des Radioimmunoassays und der proteinchemischen Analyse direkt untersucht, oder zu Einzelzellklonen weiter passagiert.

2.2.7. Transient transfizierte INS-1 Mischklone

Nach der Transfektion der INS-1 Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFPC1 (Clontech, Heidelberg) bzw. mit den G-Protein α -Sense-/Antisense-Vektoren mittels Elektroporation wurden die Zellen direkt auf Glasplättchen ausgesät. Anschließend wurden elektrophysiologisch Ganzzell-Ionenströme gemessen. Zur Unterscheidung zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen diente der Expressionsmarker EGFP, dessen Expression in transient transfizierten Zellen zu einer Fluoreszenz der Zellen führt. Diese wird bei einer Wellenlänge von Exzitation 488 nm bzw. Emission 507 nm mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert.

Als transient transfizierte Zellklone werden Zellen bezeichnet, die über den Vektor eingebrachte Eigenschaften (z.B. Fluoreszenz oder Antibiotikaresistenz) nach kurzer Zeit wieder verlieren, d.h. sie werden nicht über eine längere Zellpassage aktiv selektioniert. Diese Zellen werden, wie unter 2.2.5. beschrieben, nur für kurzfristige funktionelle Messungen verwendet, um generelle Effekte auf transfizierte Zielzellen zu untersuchen. Die Mischung aus transient transfizierten, fluoreszierenden und nicht transfizierten Zellen wird im Folgenden auch als Mischklon bezeichnet.

Sollten die transient transfizierten INS-1 Zellen für die proteinbiochemische Analyse mittels der SDS-PAGE weiterverwendet werden, so wurden die Mischklone nach der Elektroporation auf Gewebekulturflaschen ausgesät. Alle drei Tage erfolgte ein

Medienwechsel bis zum subkonfluenten Wachstum der transient transfizierten Mischklone, die dann anschließend für die SDS-PAGE weiter prozessiert wurden.

2.2.8. Selektion stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone

Als Einzelzellklone werden transfizierte Klone bezeichnet, die über einen längeren Zeitraum aktiv selektioniert werden und über den Vektor eingebrachte Gene, Reportergene oder Antibiotikaresistenzen stabil exprimieren. Der eingebrachte Vektor wird ebenso wie bei der transienten Transfektion in das zelluläre Genom integriert.

Die aktive Selektion kann entweder über eine Vektor vermittelte Antibiotikaresistenz (G418, Geneticin) oder bei Existenz eines Reportergens im eingebrachten Vektor über eine FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter, Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer), bei der fluoreszierende von nicht fluoreszierenden Zellen separiert werden, erfolgen. Über Elektroporation transfizierte INS-1 Zellen wurden auf unbeschichteten 10 cm Schalen ausplattiert. Die Selektion der transfizierten Zellen mittels der Antibiotikaresistenz erfolgte über einen Zeitraum von 2-4 Wochen durch Zugabe von G418 zum VM im Intervall von 72 h. Während dieser Zeit wiesen die resistenten INS-1 Zellen ein typisches Kolonienwachstum auf. Die nicht-resistenten Zellen starben und wurden bei dem alle drei Tage erfolgreichem Medienwechsel von den Schalen entfernt. Die transfizierten Zellklone wurden nach vierwöchiger G418-Selektion dann weiter passagiert, indem sie von 10 cm Schalen auf 96er Multiwells (MWs) umgesetzt wurden.

Dazu wurde das Medium vorsichtig entfernt, den selektionierten Klonen wurden 10 ml 37°C warmes PBS zugegeben. Die Klone wurden dann in 20 µl PBS aufgenommen und in je eine Vertiefung eines 96er MWs, in die jeweils 50 µl Trypsin vorgelegt worden war, überführt. Die Trypsinreaktion in den Wells, durch die die Zellen der Einzelzellklon-Kolonien vereinzelt werden sollten, wurde nach 5 min bei RT durch Zugabe von 200 µl VM abgestoppt. Danach wurden die trypsinisierten Zellklone über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator aufbewahrt, um den Zellen das Anheften zu ermöglichen. Am anderen Tag erfolgte der Medienwechsel, um die Reste des Trypsins und des PBS von den Zellen zu entfernen.

Im Stadium der Subkonfluenz wurden die Zellen erneut passagiert, die Passage erfolgte von 96er MWs auf 48er MWs, anschließend auf 24er MWs und danach auf kleine Gewebekulturflaschen. Die Passage bis zur "Aufzucht" der Einzelzellklone in großen Gewebekulturflaschen erfolgte über einen Zeitraum von 4-6 Monaten. Danach waren die so erhaltenen Einzelzellklone zur weiteren Analyse verfügbar, die Klone wurden in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.3. Molekularbiologie

2.3.1. RNA-Extraktion und die Polymerasekettenreaktion

2.3.1.1. RT-PCR: RNA-Isolierung und cDNA aus INS-1 Zellen

Aus subkonfluent gewachsenen INS-1 Zellen wurde mittels der Caesiumchlorid-Methode die RNA isoliert. Anschließend wurde eine DNase-Behandlung der Probe durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden und um auszuschließen, dass die später enthaltenen PCR-Produkte genomischen Ursprungs waren.

Nach Durchführung der DNase-Behandlung wurde die RNA über das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben: Die Reverse Transkriptase ist ein in Retroviren vorhandenes Enzym, das RNA in cDNA umschreibt. Nachdem die RNA in cDNA transkribiert worden war, wurde diese über die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert.

2.3.1.2. Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein automatisierter Prozess, in dessen Verlauf cDNA-Sequenzen vermehrt bzw. „amplifiziert“ werden. Oligonukleotid-Primer, kurze Basensequenzen von 18 - 23 Basenpaaren, hybridisieren (oder „annealen“) mit der komplementären Matrix-DNA. Die thermostabile Taq-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* fügt anschließend einzelne Nukleotide an die kurzen Oligonukleotidprimer und verlängert diese so zu einem vollständigen komplementären DNA-Strang. Dieser Vorgang wird auch als Elongation bezeichnet. Da die Elongation mit den die Matrix-DNA einrahmenden forward- und den reverse- Oligonukleotidprimern durchgeführt wird, entstehen bei jeder Replikation aus einem Ursprungsstrang zwei neue Tochterstränge. Dies führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Ausgangssequenz.

Auswahl der Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotide (Oligonukleotid-Primer) sind kurze DNA-Sequenzen komplementär zur Matrix-DNA. Die Oligonukleotide binden an die Matrix-DNA und durch die Taq-Polymerase wird der gebundene Oligonukleotid-Primer durch Hinzufügen von Nukleotiden zum vollständigen DNA-Strang verlängert. Man unterscheidet zwischen sogenannten forward- (sense oder downstream) und reverse-Oligonukleotid-Primern (antisense oder upstream). Der forward Primer bindet an den Antisense-Strang, die Taq-Polymerase fügt dann Nukleotide an den Primer und verlängert so diesen zum komplementären DNA-Strang. Durch die Bindung des reverse-Primers an den Sense-Strang der Matrix-DNA wird der Antisense-Strang synthetisiert und vervielfältigt. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe des Software-Programms GeneRunner V3.0 (Hastings-Software) ausgewählt. Bei der Auswahl der Primer wurden folgende Faktoren untersucht: Die Oligonukleotid-Primer sollten eine Länge von 18 bis 23 Basenpaaren pro Primer besitzen, das GC/AT-Verhältnis sollte 50% betragen. Die Annealingtemperatur, die

Temperatur bei der die Oligonuklotid-Primer spezifisch an die Matrix-DNA binden, sollte bei beiden Primern ungefähr gleich hoch sein (die Annealingtemperatur berechnet sich aus dem GC/AT-Gehalt der Primer wobei G und C jeweils 4°C und A und T jeweils 2°C entsprechen). Zur besseren Bindung der Primer an den DNA-Strang wurden diese so gewählt, dass die 5'- und 3'- Enden GC-haltig waren, da die Basenpaarung Cytosin/Guanin durch die Ausbildung von 3 Wasserstoffbrückenbindungen im Gegensatz zum Adenin und Thymin, die nur zwei Wasserstoffbrücken untereinander ausbilden, stärker ist.

Zusätzlich wurden die Primer auf Sekundärstrukturen zur Vermeidung von intramolekularen Haarnadelbildungen (Loopbildungen) oder intermolekularen Primerdimerisierungen hin untersucht (Oligonukleotid-Primer können durch die Ausbildung intramolekularer Loopbildung oder durch Primerdimerisierung nicht mehr an die DNA-Matrix binden, wodurch es zum Verlust dieser Primer kommt).

Die lyophilisierten Primer wurden in A. bidest gelöst und mittels photometrischer Messung bestimmt, indem 2.5 µl der Primerlösung in 1 ml A. bidest gelöst und bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen wurden. Nach Messung der Primerkonzentration wurde dieser auf eine Endkonzentration von 50 µM eingestellt.

TAQ-Polymerase

Zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion wurde die Taq/Amplitaq-Polymerase (Perkin Elmer) verwendet. Das thermostabile Enzym, das aus dem Organismus *Thermus aquaticus* isoliert wurde, besitzt eine optimale Synthesetemperatur bei 70-80°C. Bei dieser Temperatur synthetisiert es cDNA mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Basen pro Sekunde. Die Taq/Amplitaq hinterlässt am terminalen 3'-Ende der synthetisierten PCR-Produkte ein einzelnes 3'-dA-Nukleotid. Blunt-End Ligationen (Ligationen bei denen PCR-Produkte mit glatten Enden (Blunt End) in Vektoren einligiert werden) werden durch die 3'-dA-Nukleotide erschwert. Deshalb wurde bei der späteren Klonierung der pCR2.1TOPO-Vektor verwendet, der ein 5'-T Überhang in der Multiple Cloning Site (MCS, Sequenz mit zahlreichen, einzigartigen Restriktionsschnittstellen) besitzt, an welches kovalent eine Topoisomerase gebunden ist.

Zum analytischen Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten in INS-1 Zellen wurden die G-Protein α -Untereinheiten auf Transkriptionsebene durch die Anwendung der PCR nachgewiesen. Zur Amplifikation der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$ (M17527, 1.941 kb), $G\alpha i2$ (M17528, 1.748 kb), $G\alpha i3$ (M20713, 3.072 kb) und $G\alpha o$ (M17526, 2.061 kb) über die PCR wurden die in Tabelle 2.1. aufgeführten Primer P1i1/P2i1 für $G\alpha i1$, P1i2/P2i2 für $G\alpha i2$, P1i3/P2i3 für $G\alpha i3$ und P1o/P2o für $G\alpha o$ verwendet.

G α	Accession Nr.*	Name	Primer 5'-3'	Anzahl der Basen	Annealing
G α i1	M17527 (1.941 kb) nt651 - nt1.217 kb	P1i1-f	GAGTACCAGCTGAACGATTC	20	60°C
		P2i1-r	CTGCACATTCTTCGTATCCG	20	60°C
G α i2	M17528 (1.748 kb) nt743 - nt1.158 kb	P1i2-f	GATGTTTGTATGTGGGTGGTC	20	60°C
		P2i2-r	CACAAACTGCACGTTCTTGG	20	60°C
G α i3	M20713 (3.072 kb) nt450 - nt1.038 kb	P1i3-f	CTAGCAGGCGTGATTAACG	20	60°C
		P2i3-r	CTCCTTGGTGTCTTTCTTC	20	60°C
G α o	M17526 (2.061 kb) nt1.155 - nt1.740 kb	P1o-f	CFACTCTGCCAAATACTACC	20	60°C
		P2o-r	GCAATGATGATGTCGGTGAC	20	60°C

Tabelle 2.1.: Primer zum Nachweis und zur Amplifikation der G α -Untereinheiten in INS-1 Zellen (*Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA)

Der PCR-Ansatz für jedes G-Protein wurde final in 50 μ l Endvolumen auf Eis angesetzt und enthielt:

Taq-Reaktionsansatz

Taq 10xPuffer	:	5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	:	1 μ l
forward Primer (50 μ M)	:	1.25 μ l
reverse Primer (50 μ M)	:	1.25 μ l
cDNA	:	1 μ l
dNTPs Mix (je 10 mM)	:	1 μ l
Taq-Polymerase (1 U/ μ l)	:	1 μ l
DEPC behandeltes H ₂ O ad 50 μ l	:	38.5 μ l

Die PCR-Ansätze wurden, um eine Kondensation des Wassers am oberen Gefäßrand zu vermeiden, mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Der PCR-Lauf erfolgte nach einem standardisierten PCR-Protokoll in dünnwandigen 0.5 ml PCR-Gefäßen (Perkin-Elmer, Weiterstedt) in einem Biometra-Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen):

Zyklusparameter

1. Initiale Denaturierungsphase der DNA 94°C - 5'
2. Denaturierung der DNA 94°C - 30''
3. Bindung der Primer (Annealing) 63°C - 45''
4. Extension der Primer (Elongation) 72°C - 1'
5. Wiederholung der Schritte 1-4 29 Zyklen
6. Abschließende Extension 72°C - 15'
7. Lagerung 4°C

Nach Beendigung des PCR-Laufs wurde zur Kontrolle der PCR und der Produktlängen 5 µl der PCR-Produkte gegen den DNA-100bp-Marker auf ein 2%iges Metaphor-Agarosegel aufgetragen.

2.3.2. Klonierung der PCR-Produkte

2.3.2.1. Isolierung und Reinigung der PCR-Produkte

Bevor die cDNA-Fragmente in einen Vektor subkloniert wurden, wurde die amplifizierte cDNA mittels des Qiagen PCR Purification Kits von niedermolekularen Substanzen gereinigt. Durch die selektive Adsorption von cDNA an Silikat in Gegenwart von chaotropen Salzen können Produkte in der Größe von 100 bp - 10 kb von Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymeraserückständen isoliert und so gereinigt werden.

Dazu wurden 250 µl PB-Puffer zu 50 µl PCR-Ansatz gegeben, kurz gemischt und anschließend auf die Qiaquick Spin Säule pipettiert. Zur Verbesserung der cDNA-Silikat-Bindung wurde der Ansatz für 1 min bei RT stehen gelassen, anschließend für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach wurde die gebundene cDNA mit 750 µl PE Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zur vollständigen Entfernung des Ethanol wurden die Säulen erneut für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen.

Zur Elution der gebundenen, aufgereinigten cDNA-Produkte wurde die Säule auf ein Eppendorff-Reaktionsgefäß gefügt, in das Zentrum der Silica-Membran wurden 30-50 µl Elution Puffer EB pipettiert und für 1 min bei RT zur vollständigen Elution bzw. zur Lösung der cDNA aus der Silica-Membran stehen gelassen. Die Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 10.000 x g, die eluierte cDNA wurde anschließend entweder sofort für die Ligation weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren. Wurde die cDNA für die Ligation weiterverwendet, so wurde die Qualität und Quantität vorher auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.3.2.2. Der Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO

Der pCR2.1TOPO-Vektor wurde für die Ligation verwendet, um sich die Eigenschaften der Taq-Polymerase, die aufgrund der terminalen Transferaseaktivität ein nicht zur DNA-Matrize gehörendes, terminales 3'-Adenin an die PCR-Produkte fügt, zunutze zu machen.

Der Vektor pCR2.1TOPO beinhaltet eine als Polylinker Site bezeichnete MCS mit einer ungepaarten Thyminbase am 5'-Ende (kovalent gebundene Topoisomerase I am Thymin), flankiert von einem T7 Promotor downstream und einer M13-Reverse Priming Site zur Sequenzierung upstream, ein LacZ α -Gen, in welchem die Polylinkersite lokalisiert ist und welches der Blau/Weiss-Selektion dient (α -Komplementation), sowie zwei verschiedene Antibiotikaresistenzen (Ampicilin, Kanamycin) zur späteren Selektion nach bakterieller Hitzeschocktransformation (Abbildung 2.1.).

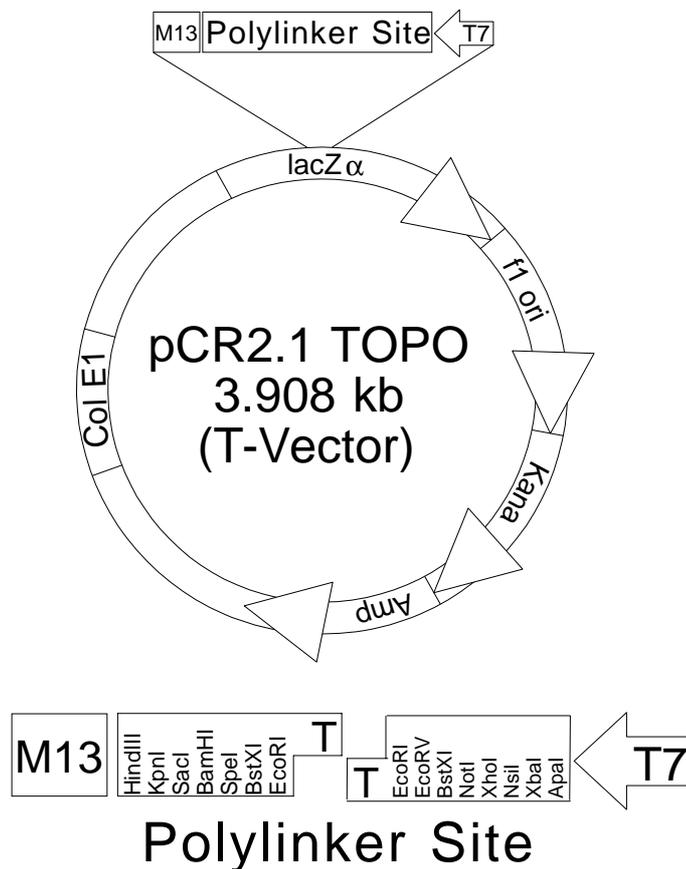


Abbildung 2.1.: Vektor pCR2.1TOPO (T-Vektor)

Der pCR2.1TOPO-Vektor wurde deshalb für die Ligation der PCR-Produkte verwendet, weil die Ligation der durch die TAQ-Polymerase synthetisierten, mit einem terminalen 3'-Adeninüberhang versehenen, PCR-Produkte durch das komplementäre 5'-Thymin in der Polylinkersite wesentlich erleichtert wurde. Die Dauer und die Effizienz der Ligation waren ebenfalls ein entscheidendes Kriterium: Standard Blunt-End-Ligation von PCR-Produkten in Vektoren können mehrere Stunden dauern oder müssen sogar über Nacht durchgeführt werden. Die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1TOPO ist nach 5 min bei RT beendet. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Blau/Weiss-Selektion (α -Komplementation). Wie oben schon erwähnt, besitzt der pCR2.1TOPO-Vektor das LacZ α -Gen, welches für die β -Galaktosidase kodiert. In diesem Gen ist die Polylinkersite lokalisiert (Abbildung 2.1.). Nach der Ligation werden die Vektoren in kompetenten Bakterien (XLI-Blue) transformiert und auf mit IPTG (Induktor) und X-Gal (Substrat der β -Galaktosidase) beschichteten Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Enthält die Polylinkersite kein Insert, so wird das LacZ α -Gen abgelesen, die β -Galaktosidase spaltet das X-Gal auf den Agarplatten, wodurch es zur Bildung eines Indolderivates und zur Blaufärbung der Kolonien kommt. In diesem Fall sind die Bakterienklone negativ, enthalten kein cDNA-Fragment.

War die Ligation des PCR-Produktes erfolgreich, so kam es zur Verschiebung des Leserasters im LacZ α -Gen, die β -Galaktosidase konnte nicht mehr abgelesen werden, sodass es zu keiner Spaltung des X-Gals kam. Die Klone blieben farblos und hatten das PCR-Produkt inkorporiert.

Im Gegensatz dazu konnten bei Ligationen in andere Vektoren, die kein LacZ α -Gen enthielten, die Unterscheidung in positive Klone und negative Klone nicht über die α -Komplementation vorgenommen werden. In diesem Fall konnte erst über Sequenzierung oder Restriktionsanalysen festgestellt werden, ob der Vektor das Insert enthielt oder nicht. Die über die α -Komplementation selektierten positiven, weißen Bakterienklone konnten über die Antibiotikaresistenzen in LB-Flüssigmedium angezogen und durch eine analytische und anschließende präparative Plasmidextraktion untersucht und angereichert werden.

Die Ligation der PCR-Produkte in den pCR2.1TOPO-Vektor hatte weitere Vektor unabhängige Vorteile: So konnten nach der Klonierung der PCR-Produkte in den pCR2.1TOPO-Vektor die synthetisierten PCR-Produkte durch Sequenzierung identifiziert werden. Ebenso war es einfacher, über spezifische Restriktionanalysen zusätzlich die Identifikation und die Orientierung der PCR-Produkte im Vektor zu determinieren. Außerdem war es möglich durch die Anreicherung des Vektors mittels einer präparativen DNA-Isolation genügend Ausgangsmaterial für die anschließende Klonierung des PCR-Produkts in einen anderen Vektor (pEGFPC1) zu erzielen. Zusätzlich wurden durch die Einklonierung der PCR-Produkte in die MCS Restriktionsschnittstellen hinzugefügt, was die Klonierung des Inserts in einen anderen Zielvektor vereinfachte.

2.3.2.3. Ligation der PCR-Produkte

Als Ligation wird die Bildung einer Phosphodiesterbindung der 5'-Phosphat- mit der 3'-OH-Gruppe zweier DNA-Fragmente, die durch das Enzym Ligase katalysiert wird, bezeichnet. Bei der Ligation wird durch den Transfer von Adenosinmonophosphat AMP (der Kofaktoren NAD oder ATP, welche in Mammaliazellen vorhanden sind) auf die ϵ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette der Ligase ein Enzym-AMP-Komplex gebildet. AMP wird auf das 5'-Phosphatende der DNA übertragen. Die Phosphodiesterbindung wird anschließend gebildet, indem die 3'-OH-Gruppe sich mit dem aktivierten 5'-Phosphatende zusammenlagert. Die durch die PCR synthetisierten Produkte wurden zur weiteren Analyse und zur späteren Klonierung in den Vektor pCR2.1TOPO ligiert (Abbildung 2.1.).

Nach Durchführung der PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits aufgereinigt und anschließend auf Eis gelagert. Für die Ligation der PCR-Fragmente in den pCR2.1TOPO-Vektor wurde frisch synthetisierte cDNA verwendet, um den Abbau der 3'-Ende Adenosin-Überhänge zu vermeiden.

Von der PCR-Reaktion wurden 0.5 - 2 μ l (ausgehend von 10 ng/ μ l bei einer Fragmentlänge von 400 bp - 1 kb) in ein PCR-Tube pipettiert, mit sterilem Aqua bidest auf 4 μ l aufgefüllt,

anschließend wurde 1 µl pCR2.1TOPO-Vektor (10 ng Vektor/µl) zugegeben. Die Ligation erfolgte für 5 min bei RT. Danach wurde der Ligationsansatz bis zur darauffolgenden Transformation auf Eis gelagert.

2.3.3. Bakterielle Transformation und Selektion

2.3.3.1. Herstellung kompetenter E. coli XL1-Blue (modifiziert nach Maniatis)⁽¹²⁷⁾

Zur Herstellung kompetenter Bakterien XLI-Blue (Clontech) wurden 3 ml LB-Flüssigmedium einer Über-Nacht-Kultur mit E. coli Bakterien angeimpft und für ca. 10 h bei 37°C, 250 rpm inkubiert. Nach 10 h wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit 1 ml der logarithmisch wachsenden Über-Nacht-Kultur angeimpft und für 3-5 h kultiviert bis die optische Dichte der Bakteriensuspension gemessen gegen den Blindwert (LB-Flüssigmedium) OD₆₀₀ = 1.0 ergab. Die Bakterien wurden auf 50 ml Greiner Röhrchen verteilt, 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und die Pellets in insgesamt 20 ml kalter 0.1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Danach wurde die Bakteriensuspension 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, die Pellets wurden in insgesamt 20 ml 0.1 M MgCl₂ resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 5000 rpm 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 10 ml kaltem 0.1 M CaCl₂ + 15% Glycerol resuspendiert und je 500 µl wurden in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen pipettiert und sofort bei -80°C eingefroren.

2.3.3.2. Hitzeschocktransformation kompetenter E.coli

Als Transformation wird die Einbringung von DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Die Transformation wurde über Hitzeschockinduktion durchgeführt. Zur Vorbereitung der Transformation wurden 15 ml Polypropylengefäße auf Eis gestellt und kompetente E.coli-Bakterien wurden von -80°C langsam für 30 min auf Eis aufgetaut. Pro Ligationsansatz wurde ein Transformationsansatz, zusätzlich eine Positivkontrolle (Transformationseffizienz) und eine Negativkontrolle (Wirkung des Antibiotikums) angesetzt.

50 - 100 µl kompetente Bakterien wurden einmal vorsichtig aufpipettiert und in die 15 ml Polypropylengefäße gegeben. Zu diesen kompetenten Bakterien wurden jeweils 5 µl pro Ligationsansatz und 100 ng der beiden Kontrollvektoren hinzugesetzt. Um die Transformationsansätze zu vermischen, wurden die kompetenten Bakterien und die darin befindlichen Vektoren vorsichtig mit der Eppendorff-Pipettenspitze umgerührt. Der Transformationsansatz wurde dann für 30 min auf Eis gelagert. Die anschließende Hitzeschockinduktion, in deren Verlauf die Zellmembranen der kompetenten Bakterien für die Vektoren permeabel werden, erfolgte bei 42°C für 1 min im Wasserbad. Die Transformationsansätze wurden danach für 5 min auf Eis aufbewahrt, anschließend mit jeweils 1 ml LB-Flüssigmedium versetzt und für 1 h bei 250 rpm 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Agarplatten vorbereitet. Für die Transformation von pEGFPC1 basierten Vektoren wurden Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin verwendet, für die

Transformation aller anderen Vektoren wurden Agarplatten mit dem Antibiotikum Ampicillin benutzt. Wurden kompetente Bakterien mit Vektoren, die ein LacZ α -Gen enthielten, wie z.B. dem pCR2.1TOPO, transformiert, so war es notwendig, die Agarplatten vor dem Ausplattieren zu behandeln: Der Vektor pCR2.1TOPO besitzt das LacZ α -Gen, welches bei erfolgreicher Ligation durch die Insertion des PCR-Produktes in die Polylinkersite nicht mehr richtig abgelesen werden kann und zu einer Weißfärbung der Kolonien führt .

Für diese Blue/White-Selektion positiver Klone (α -Komplementation) wurde X-Gal als Substrat und IPTG als Induktor benötigt, mit denen die Ampicillin-Agarplatten 1 h vor Ausplattieren der transformierten Bakterien bestrichen wurden; beide Substanzen sollten bis zum Ausplattieren der transformierten Bakterienklone eingetrocknet sein. Sollte die Transformation mit Vektoren ohne β -Galaktosidase-Gen durchgeführt werden (mit den Vektoren pEGFPC1 oder pEGFPC1-), so blieben die Agarplatten unbehandelt und wurden 1 h vor dem Ausplattieren auf RT aufgewärmt.

Nachdem die Zellen für 1 h bei 37°C gewachsen waren, wurden pro Transformationsansatz jeweils 1 x 100 - 150 μ l und 1 x 400 - 500 μ l Bakteriensuspension ausplattiert und im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt. Transformationen mit dem pCR2.1TOPO Vektor wurden am anderen Morgen 3 - 5 h bei 4°C aufbewahrt, um eine gute Farbentwicklung der Blue/White-Kolonien zu ermöglichen. Transformationen mit anderen Vektoren wurden bis zur Aufzucht der Klone bei 4°C aufbewahrt.

2.3.3.3. Selektion transformierter E.coli-Kolonien

Nach 16 h Wachstum wurden die Klone selektiert. Bakterien, welche mit dem pCR2.1TOPO-Vektor transformiert worden waren, wurden zur besseren Ausbildung der Blaufärbung für 3 - 5 h bei 4°C aufbewahrt. Pro Klon wurden je 3 ml LB-Flüssigmedium mit einem vom Vektor abhängigen Antibiotikum versetzt und in ein 12 ml Falcon Tube gegeben. Die Klone wurden mit einer autoklavierten Eppendorffpipettenspitze vorsichtig von der Agarplatte aufgenommen und in die 12 ml Falcon Tubes überführt. Die Aufzucht der Klone erfolgte über Nacht bei 37°C und 250 rpm.

2.3.4. Analyse der Bakterien-Klone

2.3.4.1. Analytische Plasmidpräparation aus E.coli

Für die analytische Plasmidpräparation wurden der Über-Nacht-Kultur je 1 ml entnommen, in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 5000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 100 μ l Resuspensionspuffer P1 resuspendiert, anschließend mit 100 μ l alkalischem Lysispuffer P2 lysiert und bei RT für 5 min vorsichtig geschüttelt. Bei der alkalischen Lyse wurden die Bakterien aufgebrochen, die chromosomale DNA wurde von der vektorialen getrennt. Eine

Scherung der chromosomalen DNA durch zu heftiges Schütteln ist zu vermeiden, da dies ansonsten zu einer Verunreinigung der vektoriellen DNA mit Fragmenten der chromosomalen DNA führen würde.

Danach wurde die alkalische Lösung durch Zugabe von 100 µl Neutralisierungspuffer P3 für 10 min auf Eis neutralisiert, alle 5 min vorsichtig geschüttelt und anschließend für 30 min bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert.

Durch die Zugabe der Puffer P1, P2 und P3 erfolgte eine alkalische Lyse der Bakterien, die Proteine wurden über das Kaliumacetat präzipitiert und die Lipide über das SDS solubilisiert. Anschließend erfolgt eine Neutralisation und Präzipitation der K-SDS-Addukte.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 200 µl 4°C kaltem Isopropanol (100%) versetzt. Nachdem die Lösung für 30 min bei RT inkubiert worden war, erfolgte die DNA-Fällung durch Zentrifugation für 45 min bei 4°C und 10.000 x g. Nach der Präzipitation wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl Ethanol (70%) erneut bei 4°C für 15 min und bei 10.000 x g zentrifugiert. Nachdem die DNA so von Salzen aufgereinigt worden war, wurde der Überstand verworfen, daß DNA-Pellet bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend in 30 µl A. bidest resuspendiert.

2.3.4.2. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der bei der analytischen Plasmidpräparation gewonnenen DNA wurden 4 x 1 µl DNA in je 100 µl Aqua bidest verdünnt, bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen. Anschließend wurde die DNA -Konzentration nach der Formel

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor für vektorielle DNA (50)} = \mu\text{g DNA} / \mu\text{l}$$

errechnet. Der Reinheitsgrad der DNA ergab sich aus dem Quotienten der optischen Dichte:

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = \text{Reinheitsgrad der DNA}$$

Dieser Wert sollte zwischen 1.6 und 1.8 liegen, da bei diesem Wert der Reinheitsgrad der DNA am höchsten ist. Weicht der Wert davon ab, so bedeutet dies eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Salzen. Diese Kontamination kann jedoch durch eine DNA-Fällung und Aufreinigung beseitigt werden.

2.3.5. Identifizierung und Analyse positiver Bakterienklone

2.3.5.1. Enzymatische Restriktionsanalyse

Für die enzymatische Restriktionsanalyse der erhaltenen Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen mussten geeignete Restriktionsschnittstellen ermittelt werden, die bei

Verdau des Vektors mit diesen ein definiertes Bandenprofil lieferten. Bei der Wahl der Enzyme ist darauf zu achten, dass sowohl die verwendeten Puffer für die Enzyme als auch die Temperaturoptima, bei denen die jeweiligen Restriktionsverdau durchgeführt werden, übereinstimmen. Die notwendigen Angaben über Puffer und Temperaturoptima der Restriktionsenzyme wurden den jeweiligen Herstellerinformationen entnommen. Nach Wahl der Restriktionsenzyme wurden 0.5 – 1 µg DNA des Vektors aus der analytischen Plasmidpräparation erhaltenen Lösung mit 2 µl des entsprechenden 10x konzentrierten Puffers und 3 - 5 Units (U) Restriktionsenzym/µg DNA versetzt und mit A. bidest ad 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Die enzymatische Restriktion der DNA erfolgte bei 37°C über Nacht im Wärmeschrank. Der Verdau wurde am anderen Tag entweder direkt auf ein Agarosegel aufgetragen oder bei 4°C bis zum Auftrag aufbewahrt.

2.3.5.2. Enzymatische Restriktion mit verschiedenen Temperaturoptima/Puffern

Wurde eine enzymatische Restriktion mit 2 Enzymen, die unterschiedliche Temperaturoptima benötigten (z.B. Enzym 1 = 25°C, Enzym 2 = 37°C), durchgeführt, so geschah dies sequentiell: Zuerst wurde der Verdau mit dem Enzym mit dem niedrigeren Temperaturoptimum (z.B. 25°C) für 3 - 5 h durchgeführt, anschließend wurde das Enzym mit dem höheren Temperaturoptimum (z.B. 37°C) zupipettiert, der Restriktionsverdau erneut für 3 - 5 h oder über Nacht inkubiert.

Musste eine enzymatische Restriktion mit unterschiedlichen Puffern oder mit unterschiedlichen Puffern und bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden, so empfahl sich zuerst der Verdau mit dem ersten Enzym, gefolgt von einer Gelextraktion der linearisierten DNA und anschließend der Verdau mit dem zweiten Enzym (Dieses Vorgehen wird häufig bei Vorbereitungen von Ligationen angewandt).

2.3.5.3. Horizontale Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren in der viskosen Gelmatrix einer horizontalen Agarosegelelektrophorese wird ermöglicht durch die hohe negative Überschussladung der DNA-Moleküle, die im Agarosegel zur Anode wandern. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren von der Molekülgröße ab: Kleinere Moleküle wandern schneller als größere. Die Nukleinsäuren können anschließend durch den Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid, welches sich an die DNA anlagert, unter UV-Licht visualisiert werden.

Bei der Wahl der Siebgröße/Prozentigkeit der Agarosegele kam es darauf an, welche Fragmentlängen der geschnittenen DNA untersucht werden sollten. Um eine optimale Auflösung bzw. Trennung des erhaltenen DNA-Bandenprofils zu erzielen, wurden für die Auftrennung von 500 bp – 6 kB großen Fragmenten 0.8 - 1%ige Agarosegele, für DNA-Fragmente von 100 bp – 1 kB 2%ige Agarosegele verwendet. Um Basen- bzw. DNA-

Fragmentlängenunterschiede von wenigen 10 - 20 bp aufzuzeigen, wurde Metaphor-Agarose verwendet werden. Für DNA-Fragmentlängen über 6 kb wurden 0.5 - 0.8%ige Gele verwendet.

Für ein 0.8%iges Agarosegel wurden 0.8 gr Agarose abgewogen, mit 100 ml 1 x TBE versetzt und in der Mikrowelle (3 min , 400 Watt) erhitzt. 50 ml der Agaroselösung wurden 2.5 µl Ethidiumbromid zugegeben, kurz gemischt und in den Gelschlitzen gefüllt. Nach 1 h wurde es in die Gelkammer gelegt und mit dem Laufpuffer 1 x TBE überschichtet. 20 µl der zu untersuchenden, aus der analytischen Plasmidpräparation stammenden, DNA-Lösung wurden nach der enzymatischen Restriktion mit 3 µl "Loading Buffer" versetzt und durch Zugabe von 1 µl 10 x H Puffer (Hoch-Salz-Puffer) der Ionenstärke des Molekulargewichtsmarkers angepasst. Als Molekulargewichtsstandard diente je nach zu untersuchender Fragmentgröße der geschnittenen DNA-Fragmente 20 µl des 100bp-Markers, 20 µl des λ-HindIII-Markers oder 20 µl des 123bp-Markers. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 mV für 1-2 h. Danach erfolgt die Analyse des Gels sowie die photographische Dokumentation auf der UV-Bank. Die positiven Klone wurden anschließend für die Sequenzierung und für die präparative Plasmidpräparation weiter prozessiert.

2.3.5.4. Sequenzierung vektorieller DNA

Der DNA-Gehalt der synthetisierten PCR-Fragmente wurde vor der Sequenzierung photometrisch gemessen. Für die Sequenzierung vektorieller DNA wurden 150 - 300 ng Plasmid mit 10 nmol des Oligonukleotid-Primers in 6 µl autoklaviertem A. bidest verdünnt. Die Sequenzierung erfolgte im ZMMK-Servicelabor (Zentrum für Molekulare Medizin in Köln) mittels des ABI Prism™ 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems mit der Taq FS BigDye-Terminator Cycle Sequencing Methode (mit BIGDYE Farbstoffen). Eine Aufreinigung der PCR-Fragmente mittels Gelextraktion oder über das PCR-Purification Kit konnte vor der Sequenzierung durchgeführt werden, war aber nicht erforderlich. Bei der anschließenden Auswertung der Sequenzen sowie der Chromatogramme (Software Chromas Version 1.56 32Bit, Fa.: Technelysium) konnte die Qualität der Sequenzierung und der erhaltenen Sequenzen anhand der dimensionslosen Werte für die vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) die zwischen 100 und 400 liegen sollten, und anhand des Spacings, welches zwischen 9 und 15 liegen sollte, überprüft werden.

2.3.5.5. Konservierung positiver Bakterien-Klone

Zur Sicherung der Bakterienklone, die über die Restriktionsanalyse und mittels Sequenzierung als positiv identifiziert worden waren, wurden 500 µl der positiven Klone mit 500µl Einfriermedium versetzt, in 1.5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.6. Anreicherung und Isolierung der DNA positiver Bakterienklone

2.3.6.1. Vermehrung rekombinanter Klone

Von dem über den Restriktionsverdau und die Sequenzierung als positiv identifizierten Klon wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum mit 100 µl der Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Alternativ konnte der, über die analytische Plasmidpräparation isolierte Vektor neu transformiert werden. Dazu wurde der Vektor mittels Hitzeschock für 1 min bei 42°C in die kompetenten Zellen eingebracht und für 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert; das anschließende Wachstum in 100 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum erfolgte über Nacht bei 37°C und 250 rpm.

2.3.6.2. Präparative Plasmidpräparation

Im Gegensatz zur analytischen DNA-Isolierung, bei der positive von negativen Klonen unterschieden werden sollen, dient die präparative DNA-Isolierung der Anreicherung bzw. der Vermehrung der als positiv identifizierten Bakterienklone. Die DNA dieser Klone steht dann für weitere Experimente wie z.B. Klonierungen in einen anderen Vektor (pEGFPC1) oder Transfektionen zur Verfügung. Das Prinzip der präparativen Plasmidpräparation mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits beruht auf der Bindung von DNA an Anionenaustauschersäulen auf der Basis von Kieselgel-Membranen.

Nach 16 h Wachstum der Bakterienklone wurden jeweils 100 ml der Bakteriensuspension für 5 min bei 5000 x g bei 4°C zentrifugiert (Beckmann J2HS, Rotor JA14) und der Überstand wurde verworfen. Nachdem das Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer P1 (100 mg/l RNase, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.8) resuspendiert worden war, wurde es mit 10 ml alkalischem Lysispuffer P2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) lysiert und bei RT für 10 min vorsichtig geschüttelt. Danach wurde die alkalische Lösung durch Zugabe von 10 ml Neutralisierungspuffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5.5) für 20 min auf Eis neutralisiert, alle 5 min vorsichtig geschüttelt und anschließend für 30 min bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert (Beckmann J2HS, Rotor JA20).

Durch die Zugabe der Puffer P1, P2 und P3 erfolgt eine alkalische Lyse der Bakterien, die Proteine werden über das Kaliumacetat präzipitiert und die Lipide über das SDS solubilisiert. Anschließend erfolgt eine Neutralisation und Präzipitation der Kaliumacetat-SDS-Addukte.

Nachdem die Zellsuspension zweimal für 45 min bei 13.500 x g (Beckmann J2HS, Rotor JA20) zentrifugiert und Proteine sowie Zelldebris und chromosomale DNA pelletiert worden waren, wurde die sich im Überstand befindliche vektorielle DNA über Mull in ein neues 50 ml Falcon Tube filtriert. Während der Zentrifugation wurden die Silikat-Anionenaustauschersäulen mit 30 ml Equilibrierungspuffer QBT (750 mM NaCl₂, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol, 0.15% Triton X100, pH 7.0) equilibriert. Anschließend wurde der filtrierte Überstand auf die Säulen gegeben. Nach Bindung der vektoriiellen DNA an die Silicat-Membran der

Säulen, wurde 2 x mit 20 ml Puffer QC (1 M NaCl₂, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol, pH 8.5) gewaschen, die DNA wurde anschließend mit 10.5 ml QF (1.25 M NaCl₂, 50 mM Tris-HCl, 15% (v/v) Ethanol pH 8.5) aus der Silicat-Membran eluiert, mit 15 ml 4°C kaltem Isopropanol (100%) versetzt und für 1 h bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Nach Fällung der DNA wurde diese einmal mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen und bei 5000 rpm bei 4°C für 15 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Das DNA-Pellet wurde im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet, danach in 250 µl autoklaviertem A. bidest resuspendiert und, nachdem die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch ermittelt worden war, bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.3.7. Herstellung der Sense-/Antisense-EGFP-Fusionskonstrukte

2.3.7.1. Der Mammalia-Expressionsvektor pEGFPC1

Als Zielvektor für die Klonierung der PCR-Produkte wurde, zur Synthese von Fusionsproteinen bzw. von Fusions-mRNA (bestehend aus EGFP und PCR-Fragment) der Vektor pEGFPC1 gewählt.

Der Vektor pEGFPC1 beinhaltet das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), den Cytomegalovirus-Immediate Early Promotor (CMV IE), durch den die Ablesung des EGFP-Gens erfolgt, eine MCS downstream des EGFP-Gens und eine Kanamycin/Neomycinresistenz zur Selektion über die Antibiotika Kanamycin bzw. Geneticin in Bakterien bzw. Mammaliazellen (Abbildung 2.2.). Die synthetisierten PCR-Produkte sollten downstream des EGFP zur späteren Durchführung von antisense-Experimenten in die MCS ligiert werden. Durch die Synthese von Fusionsproteinen bzw. Fusions-mRNA (EGFP/PCR-Produkte in Sense/Antisense-Orientierung) sollte das EGFP als Reportergen über die Fluoreszenz die Expression der antisense-EGFP bzw. der Sense-EGFP-Fusions-mRNA belegen.

Der Vektor konnte nach Ligation der PCR-Produkte in die MCS und der bakteriellen Transformation über die Kanamycinresistenz selektioniert werden. Die Selektionsmöglichkeit über die Geneticin-Resistenz (G418) für spätere Transfektionen in der Insulinomazelllinie INS-1 war ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Selektion stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone. Die Kanamycin/Neomycinresistenz wurde initiiert über den SV40-Promoter (SV40 Early Promoter). Diese Eigenschaften waren erforderlich, um die INS-1 Zelllinie mit Antisense-EGFP-Konstrukten sowohl transient als auch stabil zu transfizieren.

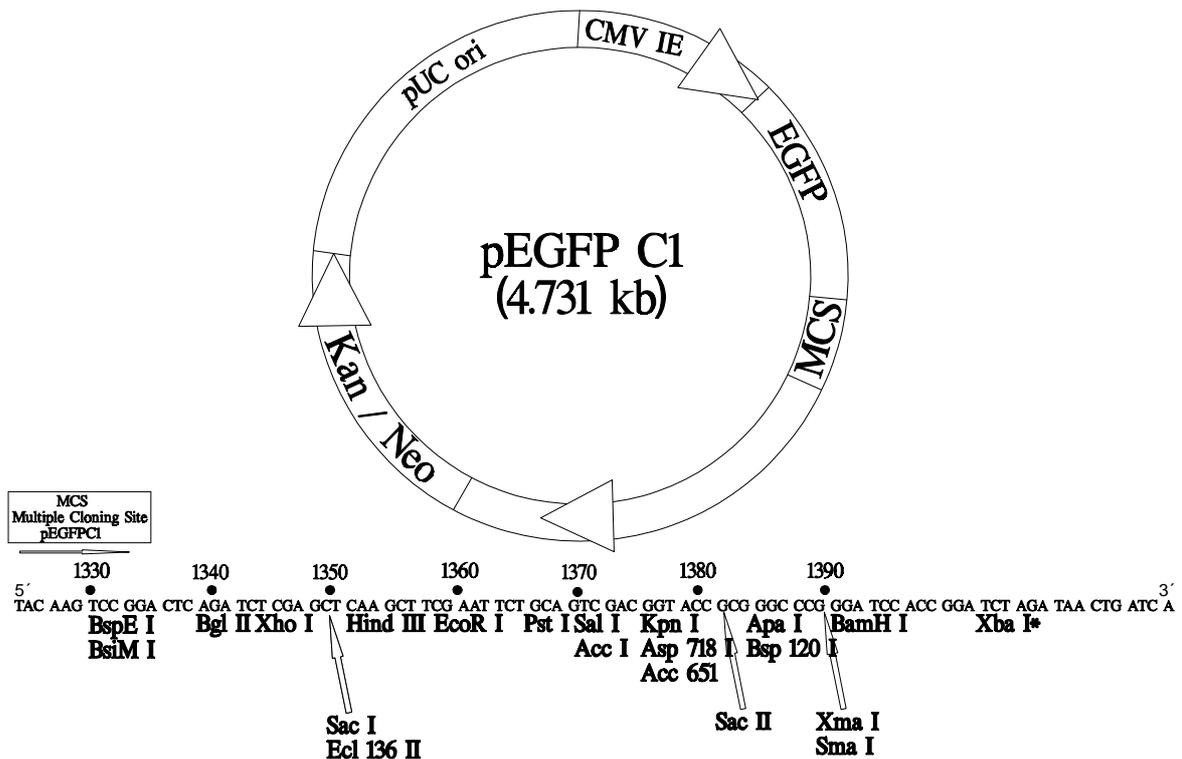


Abbildung 2.2.: Der Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 (Clontech, Heidelberg)

2.3.7.2. Enzymatische Isolierung der PCR-Produkte aus pCR2.1TOPO

Zur Durchführung der Sense/Antisense-Experimente mit dem Reporter gen EGFP wurden die PCR-Fragmente aus dem pCR2.1TOPO-Vektor ausgeschnitten und downstream des EGFP-Gens in die MCS ligiert, sodass bei Ablesung durch den CMV IE eine Fusions-mRNA entstand, die bei Translation zur Fluoreszenz der transfizierten Mammaliazelllinie INS-1 führte. Für die Ligation der PCR-Produkte wurden 5 - 10 µg der beiden benötigten Vektoren mit spezifischen Restriktionsenzymen (3 - 5 U/µg DNA) über Nacht geschnitten und am anderen Morgen auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die benötigten Fragmente unter der UV-Bank aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des Qiagen Qiaex Gel Extraction Kits aus dem Gel extrahiert.

2.3.7.3. Isolierung der PCR-Fragmente mittels Gelextraktion

Nach Durchführung des Restriktionsverdaus und der Auftrennung der erforderlichen Banden auf dem Agarosegel wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente auf der UV-Bank ausgeschnitten. Da die längere Einwirkung von UV-Strahlung zur Zerstörung der DNA führen kann, wurde die UV-Intensität während des Ausschneidens der DNA-Fragmente reduziert. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA mittels des QIAquick Extraction Kits.

Die Gelstücke wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, gewogen und im Verhältnis 3:1 mit Puffer QG versetzt (100 µg DNA/100 µl QG Puffer). Die Proben wurden für

10 min bei 50°C erhitzt. Nach vollständiger Auflösung des Gels wurde Isopropanol im Verhältnis 1:1 (100 µl Isopropanol/100 µg DNA) zur Erhöhung der DNA-Ausbeute zur Lösung zugesetzt, kurz gemischt und auf die QIAquick Säule gegeben. Um die DNA an die Silica-Membran zu binden, wurde die QIAquick Säule für 1min 10.000 x g bei RT zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen.

Zur vollständigen Reinigung der an die Silica-Membran gebundenen DNA wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säulen pipettiert, es erfolgte eine erneute Zentrifugation der Säulen für 1 min bei 10.000 x g und RT. Nachdem das Eluat verworfen worden war, wurde die DNA mit 750 µl PE Puffer gewaschen, um Salze zu entfernen.

Nach Verwerfen des Eluats erfolgte eine erneute Zentrifugation, um Reste des PE Puffers vollständig zu entfernen. Die gebundene DNA wurde anschließend in 30 - 50 µl Elutionspuffer (EB) durch Zentrifugation für 2 min bei 10.000 x g RT eluiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und anschließend bei -20°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung der isolierten DNA wurde deren Konzentration photometrisch gemessen und zusätzlich auf einem analytischen Agarosegel untersucht.

2.3.7.4. Ligation

Für die Ligation der isolierten DNA-Fragmente in die MCS downstream des EGFP-Gens in den pEGFPC1-Vektor wurden diese bei 4°C auf Eis gelagert. Vektor und Insert wurden im Verhältnis von 1:6-1:10 (z.B. 50 ng Vektor und 300 ng Insert) ligiert. 50 ng Vektor und 300 ng Insert wurden zusammengegeben und mit A. bidest ad 7 µl aufgefüllt, anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert und danach sofort auf Eis gelagert. Die Behandlung der zu ligierenden DNA-Fragmente bei 42°C soll bewirken, dass die DNA aus der coiled form in eine gestreckte Form überführt wird. Nach der Wärmebehandlung wurde der 10x Ligationspuffer und das katalysierende Enzym, die T4-DNA-Ligase (1 U/µl), zugegeben. Das Volumen des Gesamtligationsansatzes betrug 10 µl. Der Ligationansatz wurde über Nacht bei 16°C in einem Deawar-Gefäß inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden kompetente Bakterien (E. coli, XLI-Blue) mit der im Ligationansatz enthaltenen DNA transformiert. Nach Durchführung der Transformation wurden die positiven Klone von den Agarplatten selektioniert. Es erfolgte eine analytische Plasmidpräparation aus E. coli und eine enzymatische Analyse der bakteriellen Klone. Die positiven Klone wurden erneut sequenziert und anschließend für die Transfektion von INS-1 Zellen weiterverwendet.

2.4. Proteinchemie

2.4.1. Aufbereitung der Proteinproben

2.4.1.1. Gewinnung von Gesamtzellhomogenaten

Das Medium wurde von den INS-1 Zellen oder transfizierten Zellklonen dekantiert, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 250 - 500 µl 1x Sample Puffer (1x SB) resuspendiert und anschließend für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Denaturierung und Reduzierung der Proben durch Erhitzung auf 100°C hat zur Folge, dass die Proteinquartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen, welche unter anderem durch Disulfidbrücken (z.B. zwischen Cysteinen), Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen gebildet werden, aufgebrochen werden. Im denaturierten Protein werden die individuellen intramolekularen Ladungsunterschiede durch das anionische SDS, welches sich an positive Seitengruppen anlagert, ausgeglichen. Hierdurch werden auch Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben und die Aggregatbildung von Proteinen verhindert; diese Probenaufbereitung wird auch als reduzierende SDS-Behandlung bezeichnet. Die Proteinproben wurden dann bei -20°C bis zur Neuhoff-Proteinbestimmung aufbewahrt.

2.4.1.2. Gewinnung von partikulären Membranfraktionen nach Regazzi et al. ⁽¹²⁸⁾

Nach dem Trypsinieren der INS-1 Zellen wurde das Zellpellet in 250 µl subzellulärem Fraktionierungspuffer (SFP) aufgenommen. Der SFP wurde vorher mit einem Protease Inhibitor Cocktail versetzt, um eine proteolytische Degradation der Proteine durch Proteasen, welche ohne Hitzedenaturierung im SDS-Probenpuffer aktiv sein können, zu vermeiden.

Das Pellet wurde einmal mit SFP gewaschen, anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und danach für 30 min bei 4°C und 13.500 rpm zentrifugiert. Nach Trennung der cytosolischen Fraktion von der partikulären Membranfraktion wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 250 µl SFP versetzt und mittels Ultraschall resuspendiert. Die partikuläre Membranfraktion wurde mit 3x Sample Puffer (3x SB) im Verhältnis 1:2 versetzt, anschließend für 5 min bei 100°C gekocht, und bis zur Neuhoff-Proteinbestimmung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2. Proteinbestimmung nach Neuhoff ⁽¹²⁹⁾

Für die Durchführung der Proteinbestimmung zur Analyse quantitativer Westernblots mittels Immunodetektion wurde die Neuhoff-Proteinbestimmung gewählt, weil sie verglichen mit anderen Proteinbestimmungen wie Bradford, Biorad oder Lowry am unempfindlichsten auf Detergentien wie SDS oder β -Mercaptoethanol, welche im Probenpuffer (1x SB, 3x SB) vorhanden sind, reagiert.

Bei der Neuhoff-Proteinbestimmung, die auf dem Prinzip der quantitativen Tüpfelprobe basiert, werden 3 x 5 µl Probe einer Proteinlösung unbekannter Konzentration auf Cellulose-Acetatfolie aufgetragen und mit einer Amidoschwarzlösung gefärbt und fixiert. Als Leerwert für die Messungen dienten die jeweiligen Lösungen, in denen die Proteinproben aufbereitet wurden (Gesamtzellhomogenate: 1x SB, partikuläre Membranfraktion: SFP + 3x SB (2:1)). Nach einer Stunde Trocknungszeit bei RT wurde die Cellulose-Acetatfolie für 15 min in der Neuhoff-Färbelösung gefärbt, anschließend zuerst 15 min in gebrauchtem und danach für 15 min in frischem Neuhoff-Entfärbelösung entfärbt. Nach erneuter Trocknung der Cellulose-Acetatfolie für 1 h bei RT wurden die Flächen mit aufpipettierten Proteinproben ausgeschnitten, in 1.5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße gegeben und mit 1 ml DMSO versetzt. Nachdem die Proben dann über Nacht bei RT auf dem Schüttler gelöst worden waren, wurden sie am anderen Tag bei 630 nm photometrisch gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe einer Eichkurve (0.5 µg - 50 µg) bei 630 nm photometrisch gemessen. Als Blindwert diente Cellulose-Acetatfolie ohne Proteinprobe, die ebenso behandelt wurde wie die aufgetragenen Proteinproben.

2.4.3. SDS-PAGE nach Laemmli ⁽¹³⁰⁾

Bei der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden die durch SDS denaturierten Proben in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die durch Zugabe des SDS entstandenen negativ geladenen Protein-Molekülkomplexe wandern zur Anode, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel in logarithmischer Abhängigkeit umgekehrt proportional zur Proteingröße verhält.

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese wird die Gelmatrix des Polyacrylamidgels aus einem 30%igem Acrylamid/Methylenbisacrylamidgemisch (29 AA : 1 BA) gebildet, die Quervernetzung der Acrylamidmonomere durch Methylenbisacrylamid wird durch die Zugabe von APS-Lösung (10 %) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gestartet. Im Sammelgel werden die Proben umgepuffert und fokussiert, während im höherprozentigen Trenngel die Auftrennung der Proben erfolgt.

Nach Zusammenbau der Gelkassetten wurden die Trenngele für 10%ige Minigele (s. Tabelle 2.2.) gegossen und mit SDS (0.1%) überschichtet.

Substanzen	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
A.bidest	8.4 ml	3.7 ml
Tris 1.5 M, pH 8.8	4.5 ml	-----
Tris 0.5 M, pH 6.8	-----	1.5 ml
AA / BA, 40%	3.375 ml	450 µl
APS, 10%	135 µl	45 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 2.2.: Ansatz für Trenn- und Sammelgel

Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde das SDS von den Trenngelen abgegossen und die Sammelgele gegossen.

Der Probenauftrag erfolgte bei der SDS-PAGE ausschließlich durch Unterschichtung der Proben. Die Taschen wurden mit 20 µl Bromphenolblau gefüllt. Nachdem das obere und untere Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt worden war, wurden die Gele beladen.

Von einem hochmolekularen Standardmarker (SDS6H) für die Molekulargewichtsbereiche 29 – 205 kD wurden 20 µl als Kontrolle aufgetragen. Die Standards wurden benötigt, um bei der anschließenden Auswertung der Gele, die Molekulargewichte der unbekanntenen Proteinbanden über die RF-Werte ermitteln zu können. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Stimuli auf die Phosphorylierung von Calcineurin zu untersuchen, wurden nach Durchführung der Neuhoff-Proteinbestimmung jeweils 10 µg unterschiedlich stimulierter INS-1 Gesamtzellhomogenate gegeneinander aufgetragen.

Zur Detektion der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten wurden jeweils 20 µg Gesamtzellhomogenat oder 10 µg partikuläre Membranfraktion für $G\alpha_1$, $G\alpha_2$ und $G\alpha_s$ sowie 10 µg Gesamtzellhomogenat oder 5 µg partikuläre Membranfraktion für $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$ aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 80 – 100 V für 1 – 3 h bis das Bromphenolblau ausgetreten war. Für das anschließende Semi-Dry-Westernblotting wurden die Gele für 15 min bei 4°C in Transferpuffer ohne SDS equilibriert.

2.4.4. Semi-Dry-Westernblotting nach Towbin ⁽¹³¹⁾

Beim Semi-Dry-Westernblotting werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld aus dem Gel auf eine immobilisierende Membran (Nitrozellulose-Membranen) transferiert, sodass die übertragenen Proteine für immunologische Analysen mittels spezifischer Antikörper zugänglich sind.

Während die Gele für 15 min bei 4°C in Transferpuffer equilibriert wurden, wurde der Semi-Dry-Westernblot vorbereitet. Dazu wurden 7 Whatmanfilter zurecht geschnitten, von denen drei in Transferpuffer mit SDS und vier in Transferpuffer ohne SDS für 15 min eingeweicht wurden. Pro Gel wurde ein Stück Nitrozellulose (Porengröße 0.45 µm) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Dann erfolgte die Packung des Sandwiches: vier Whatmanfilter, die im Transferpuffer ohne SDS eingeweicht worden waren, wurden auf die Anode des Semi-Dry-Blotgerätes gelegt. Darüber wurden dann die Nitrocellulose, die Gele und abschließend die drei Whatmanfilter, welche in Transferpuffer mit SDS eingeweicht wurden, gelegt. Nachdem die Luftblasen aus dem Sandwich entfernt worden waren, wurde das Sandwich mit Transferpuffer befeuchtet und der Blotvorgang gestartet. Der Transfer erfolgte bei 15V mit 5.5 mA/cm² für 30 min.

2.4.5. Ponceau S-Färbung der Westernblots

Die Inkubation der Membranen mit dem Farbstoff Ponceau S, welcher die auf der Nitrozellulosemembran befindlichen Proteine färbt, dient der Überprüfung der Effizienz beim Proteintransfer. Die Bindung des Farbstoffs ist reversibel, das Ponceau S kann entweder langsam mit A. bidest oder schnell mit TBST abgewaschen werden.

Nach Beendigung des Blotvorgangs wurden die Nitrozellulosemembran mit Ponceaurot gefärbt.

Zur Kontrolle des Proteintransfers konnten die Gele, um eventuelle Proteinreste im Gel nachzuweisen, mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung gefärbt werden. Die Blots wurden für 15 min in die Ponceau S-Färbelösung gegeben. Nachdem die Blots gefärbt worden waren, wurde der Transfer der Proteine beurteilt, der Molekulargewichtsstandard abgetrennt. Nach der vollständigen Entfärbung der Blots mit A. bidest wurden sie bis zur weiteren Behandlung mit Antikörpern über Nacht bei 4°C in TBST gelagert.

2.4.6. Antikörper-Inkubation

2.4.6.1. G-Protein-Antikörper

Nach Lagerung der Transfermembran über Nacht bei 4°C in TBST wurden die Blots zweimal kurz mit frischem TBST gewaschen, anschließend wurde der polyklonale Primärantikörper, der gegen die verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten ($G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha 0$) gerichtet war, in einer Verdünnung von 1:1000 (Biomol) bzw. einer Verdünnung von 1:1.000-1:5.000 (SBCT, Santa Cruz Biotechnology) in TBST zugesetzt (Tabelle 2.3.). Die Blots wurden dann für 1 ½ h bei RT geschüttelt.

Nr.	AK gegen	Bezeichnung	1. Antikörper Verdünnung	2. Antikörper HRP gekoppelter IgG anti rabbit ^{*3} Verdünnung
1	$G\alpha i1$	SA 127 ^{*1}	1:1000	1:1000-1:5000
2	$G\alpha i1/\alpha i2$	SA 128 ^{*1}	1:1000	1:1000-1:5000
3	$G\alpha i3$	SA 129 ^{*1}	1:1000	1:1000-1:5000
4	$G\alpha i3/\alpha 0$	SA 130 ^{*1}	1:1000	1:1000-1:5000
5	$G\alpha s$	SA 131 ^{*1}	1:1000	1:1000-1:5000
6	$G\alpha i1$	sc-391 ^{*2}	1:1000-1:5000	1:1000-1:5000
7	$G\alpha i2$	sc-7276 ^{*2}	1:1000-1:5000	1:1000-1:5000
8	$G\alpha i3$	sc-262 ^{*2}	1:1000-1:5000	1:1000-1:5000
9	$G\alpha 0$	sc-387 ^{*2}	1:1000-1:5000	1:1000-1:5000
10	$G\alpha s$	sc-823 ^{*2}	1:1000-1:5000	1:1000-1:5000

Tabelle 2.3.: Antikörper zur Detektion der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha 0$

^{*1} Primärantikörper der Firma Biomol

^{*2} Primärantikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (SCBT)

^{*3} Sekundärantikörper der Firma Sigma

Nach Entfernung des Primärantikörpers wurde der Blot für 1 h mit TBST bei RT auf dem Rüttler gewaschen und danach mit dem HRP-(Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase) gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1.000-1:5.000 in TBST bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der 45-minütigen Inkubationszeit mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde dieser von den Blots abgenommen, die Blots wurden erneut für 1h bei RT auf dem Schüttler mit TBST gewaschen und anschließend sofort für die Enhanced Chemolumineszenz-Detektion (ECL) vorbereitet.

2.4.6.2. Phosloserin-/Phosphothreonin-Antikörper

Inkubation der Western mit Anti-Phosloserinantikörper (4A3/1C8))

Vor der Inkubation der Transfermembran mit dem Anti-Phosloserinantikörper (4A3/1C8) musste der Blot, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, mit BSA (0.6%, niedriger IgG-Gehalt) in TBST mit Tween 20 (0.5%) behandelt werden.

Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT auf dem Rüttler. Anschließend wurde der Blot dreimal kurz und einmal für 1 h bei RT mit TBST gewaschen, um BSA-Rückstände aus dem Blockreagenz vollständig zu entfernen. Zur Inkubation des Blots mit dem gegen phosphorylierte Serin- und Threoninseitengruppen gerichteten monoklonalen Primärantikörper wurde dieser 1:1.000-1:5.000 in TBST ohne BSA für 1½ h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Der Antikörper wurde anschließend verworfen, und der Blot 3x für 5 min und 1x für 1 h bei RT mit TBST ohne BSA gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörper (HRP-gekoppelter Anti-Maus μ -Chain specific) erfolgte bei einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST ohne BSA für 45 min bei RT auf dem Schüttler. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Transfermembran für 1h bei RT auf dem Schüttler mit TBST gewaschen und danach für die Detektionsschritte (Enhanced Chemolumineszenz) vorbereitet.

2.4.7. ECL Enhanced Chemolumineszenz

Nach der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte die Detektion der am Primärantikörper gebundenen sekundären Antikörper über die Chemolumineszenz (Enhanced Chemoluminescence, ECL). Bei der ECL mit zyklischen Diacylhydraziden (Luminol) werden diese über eine HRP (Meerrettichperoxidase)/Wasserstoffperoxid katalysierte Reaktion oxidiert. Nach der Oxidation befindet sich das Luminol im angeregten Zustand. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Licht emittiert, welches auf dem ECL-Hyperfilm eine Schwärzung verursacht.

Nachdem die Membranen 1 h mit TBST gewaschen worden waren, wurden sie vorsichtig mit Papier abgetrocknet. Dann wurden jeweils 500 μ l der ECL-Detektionslösungen 1 und 2 gemischt und auf die Blotmembranen gegeben. Die Blots wurden dann durch wiederholtes

Aufpipettieren und Überspülen für 1 min inkubiert, danach vorsichtig abgetrocknet und in Klarsichtfolie gelegt. Die ECL-Filmfolien wurden auf den versiegelten Blot gelegt. An den Stellen, an denen es zu der Reaktion der Meerrettichperoxidase mit Luminol kam, erfolgte eine Schwärzung der ECL-Folie. Die Exposition der Folien erfolgte über verschiedene Zeiträume. Die ECL-Folien wurden nach der Belichtung für 1 min im Entwickler, danach im Fixierer aufbewahrt und anschließend bei RT getrocknet.

2.5. Immuncytochemie

2.5.1. Ausplattieren und Fixierung der Zellen

Vor dem Ausplattieren der INS-1 Zellen auf Glasplättchen in 6er Multiwells (MWs) wurden die Glasplättchen für 30 min bei RT mit Polyornithin beschichtet, anschließend mit A. bidest gewaschen und bei RT zum Trocknen stehen gelassen. Eine Beschichtung der Glasplättchen wurde vorgenommen, um eine bessere Anheftung der Zellen zu gewährleisten und um ein Abspülen der Zellen bei der anschließenden immuncytochemischen Behandlung zu vermeiden.

Nachdem die INS-1 Zellen trypsiniert und mittels der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt worden waren, wurden 6 x 100.000 INS-1 Zellen ausplattiert: Pro G-Protein α -Untereinheit ($G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$) wurde 1 Ansatz und 1 Kontrollansatz ohne den primären Antikörper auf den Polyornithin beschichteten Glasplättchen, mit jeweils 2 ml VM versetzt und anschließend über Nacht im Inkubator aufbewahrt.

2.5.2. Immuncytochemische Behandlung der INS-1 Zellen

Nach Entfernen des Mediums erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehydlösung (4%) für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen 4 x 10 min mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Sollten intrazelluläre Proteine wie z.B. G-Proteine oder Cytoskelettproteine (Actin oder Tubulin) detektiert werden, so mussten die Zellen vorher durch eine Triton X100-Behandlung permeabilisiert werden. Dazu wurden die Zellen für 10 min mit Triton X100 behandelt und 2 x 10 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, um die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine in den Zellen zu blockieren, mit einer BSA-Lösung (5%) für 1 h auf dem Schüttler inkubiert und anschließend für 10 min mit TBS gewaschen. Die Antikörper-Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper (gerichtet gegen $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$) erfolgte für 2 h bei RT in einer Verdünnung von 1:500 in BSA-Lösung (0.8%) auf dem Schüttler (Tabelle 2.4.).

Nr.	AK gegen	Bezeichnung	1. Antikörper Verdünnung	2. Antikörper Cy3 gekoppelter Goat-Anti-Rabbit* ² Verdünnung
1	$G\alpha_1$	sc-391* ¹	1:500 in 0.8% BSA-Lsg.	1:800 in TBS
2	$G\alpha_2$	sc-7276* ¹	1:500 in 0.8% BSA-Lsg.	1:800 in TBS
3	$G\alpha_3$	sc-262* ¹	1:500 in 0.8% BSA-Lsg.	1:800 in TBS
4	$G\alpha_0$	sc-387* ¹	1:500 in 0.8% BSA-Lsg.	1:800 in TBS
5	$G\alpha_s$	sc-823* ¹	1:500 in 0.8% BSA-Lsg.	1:800 in TBS

Tabelle 2.4.: Antikörper zur Detektion der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$

*¹ Primärantikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (SCBT)

*² Sekundärantikörper der Firma Sigma

Nachdem die Zellen 4x 10 min mit TBS gewaschen worden waren, wurden die Glasplättchen für 15 min in Ziegen Serum (NGS) inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Cy3-gekoppelten-Sekundärantikörpers zu vermeiden. Das NGS wurde nach 15 min verworfen, die Zellen für 1 h bei RT mit dem sekundären Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper in der Verdünnung von 1:800 in TBS inkubiert (Tabelle 2.4.) und anschließend erneut für 4x 10 min mit TBS gewaschen. Nach Beendigung der Antikörperinkubation wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 95% und 100% Ethanol) entwässert und nach einer kurzen Xylolbehandlung mit Entellan und Deckgläschen als Dauerpräparate eingedeckt.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten in INS-1 Zellen

3.1.1. Molekularbiologischer Nachweis mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.1.1.1. Nachweis der Transkripte für $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$

Um die G-Protein α -Untereinheiten und deren physiologische Funktion in INS-1 Zellen mit Hilfe der Antisense-Technik zu untersuchen, wurden die G-Protein α -Untereinheiten auf Transkriptionsebene durch die Anwendung der PCR nachgewiesen. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand bereits bekannter DNA-Sequenzen aus den Riechepithelzellen der Ratte (Tabelle 3.1.) ⁽⁴⁵⁾.

$G\alpha$	Accession Nr.*	Kodierende Sequenz	Länge		Primer 5'-3'
$G\alpha 1$	M17527 (1.941 kb)	nt219 - nt1.283	1.064 kb	P1i1-f P2i1-r	GAGTACCAGCTGAACGATTC CTGCACATTCTTCGTATCCG
$G\alpha 2$	M17528 (1.748 kb)	nt151 - nt1.218	1.067 kb	P1i2-f P2i2-r	GATGTTTGATGTGGGTGGTC CACAAACTGCACGTTCTTGG
$G\alpha 3$	M20713 (3.072 kb)	nt85 - nt1.149	1.064 kb	P1i3-f P2i3-r	CTAGCAGGCGTGATTAACG CTCCTTGGTGTCTTTCTTC
$G\alpha o$	M17526 (2.061 kb)	nt707 - nt1.771	1.064 kb	P1o-f P2o-r	CGACTCTGCCAATACTACC GCAATGATGATGTCCGGTGAC

Tabelle 3.1.: Verwendete Primer für die Amplifikation der G-Protein α -Untereinheiten (*Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA). Die Positionen an denen die Primer binden, sind im Anhang 5.2. hervorgehoben (5.2. Sequenzhomologievergleich der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ -Wahl der Antisense-Sequenzen).

Da diese PCR-Produkte gleichzeitig als Antisense-Sequenzen dienen sollten, wurde die Wahl der Sequenzen auf ihre Spezifität und Homologie den anderen G-Protein α -Untereinheiten gegenüber untersucht. Die häufig gewählte Sequenz um das Startkodon ATG ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie der vier $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ zur Durchführung der Antisense-Experimente ungeeignet (Anhang 5.2. Sequenzhomologien von $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ und 5.3. Sequenzhomologievergleich der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ -Wahl der Antisense-Sequenzen). Bei Verwendung dieser Sequenz für die Durchführung der Antisense-Experimente könnte eine gezielte Repression des Proteins ohne gleichzeitige Repression eines anderen homologen Proteins nicht ausgeschlossen werden. Daher wird ein Genabschnitt mit niedrigerer Homologie downstream dieses Bereichs gewählt.

Die im Anhang 5.2. dargestellten Sequenzen zeigen eine stark konservierte Region von der Kozak-Sequenz über das erste Startkodon bis in den Bereich der ersten 200 - 300 Basenpaaren. Nachfolgend unterscheiden sich die Sequenzen der verschiedenen α -Untereinheiten zunehmend.

Nur im Vergleich zwischen G α i1 und G α i3 sowie zwischen G α i2 und G α o zeigt sich interessanterweise eine höhere Konservierung der Sequenzhomologie (nicht dargestellt in Abbildung 3.1). Nach der Wahl der Antisense-Sequenzen werden diese auf die mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen analysiert.

G α	Kozak-Seq.	Start				
i1	5' CCACC	ATGGGCTGCA	CACTGAGCGC	TGAGGACAAG	3'	
i2	5' CAGG	ATGGGCTGCA	CCGTGAGCGC	CGAGGACAAG	3'	
i3	5' CCGTC	ATGGGCTGCA	CGTTGAGCGC	CGAGGACAAG	3'	
O	5' CCACC	ATGGGATGTA	CTCTGAGCGC	AGAGGAGAGA	3'	
i1	30 bp	5' GCGGC	AGCGCAGCAA	GATGATCGAC	3'	
i2		5' GCGGC	AGCGCTCTAA	GATGATCGAC	3'	
i3		5' GCGGC	AGCGGAGTAA	GATGATCGAC	3'	
O		5' GCGGC	AGCGGAGCAA	GGCGATTGAG	3'	
i1	60 bp	5' CGCAACCTCC	GGGAGGACGG	AGAGAAGGCA	3'	
i2		5' AAGAACCTGC	GGGAGGACGG	CGAGAAGGCG	3'	
i3		5' CGCAACTTGC	GGGAGGACGG	AGAGAAAGCG	3'	
O		5' AAAAATCTCA	AAGAAGATGG	CATCAGCGCC	3'	
i1	90 bp	5' GCGCGGAGG	TCAAGCTGCT	GCTGCTGGGT	3'	
i2		5' GCACGGGAGG	TGAAGTTGCT	TCTGTTAGGT	3'	
i3		5' GCCAAAGAAG	TGAAGCTGCT	GCTGCTCGGC	3'	
O		5' GCCAAAGACG	TGAAATTACT	CCTGCTGGG	3'	
i1	120 bp	5' GCTGGTGAAT	CCGGGAAGAG	CACAATTGTG	3'	
i2		5' GCTGGAGAAT	CAGGGAAGAG	CACCATCGTC	3'	
i3		5' GCTGGAGAAT	CTGGTAAAAG	TACTATTGTG	3'	
O		5' GCTGGAGAAT	CAGGAAAAAG	CACCATTTGTG	3'	
i1	150 bp	5' AAGCAGATGA	AAATTATCCA	CGAGGCTGGC	3'	
i2		5' AAGCAGATGA	AGATCATCCA	CGAGGATGGC	3'	
i3		5' AAACAGATGA	AAATCATTCA	TGAGGATGGC	3'	
O		5' AAGCAGATGA	AGATCATCCA	TGAAGATGGC	3'	
i1	180 bp	5' TACTCAGAGG	AAGAGTGTA	GCAGTACAAA	3'	
i2		5' TACTCAGAGG	AGGAGTGCCG	GCAGTACCGT	3'	
i3		5' TATTCCGAGG	ACGAGTGTA	GCAGTATAAA	3'	
O		5' TTCTCTGGAG	AAGACGTAAA	GCAGTACAAG	3'	

Abbildung 3.1.: Partielle Sequenzvergleiche der G α -Untereinheiten G α i1, G α i2, G α i3, G α o (Die gelbe Markierung deutet auf drei- oder vierfache Übereinstimmung, die rote auf zweifache). Das Startkodon der vier verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten (Beginn der gelben Unterlegung) befindet sich am Anfang des kodierenden Bereichs für G α i1 zwischen 219 - 1.283 kb (1.064 kb), für G α i2 im Bereich zwischen 151 - 1.218 kb (1.067 kb), für G α i3 im Bereich zwischen 85 - 1.149 kb (1.064 kb) und für G α o im Bereich zwischen 707 - 1.771 kb (1.064 kb). Der vollständige Sequenzvergleich ist in Anhang 5.2. zu finden (5.2. Sequenzhomologievergleich der G-Protein α -Untereinheiten G α i1, G α i2, G α i3 und G α o-Wahl der Antisense-Sequenzen).

Über die PCR werden cDNA-Fragmente von G α i1, G α i2, G α i3 und G α o mit Hilfe der in Tabelle 3.1 angegebenen Primer amplifiziert. In den für die nachfolgenden Antisense-Experimente ausgewählten Bereichen ergeben sich für G α i1 ein PCR-Produkt in der Größe

von 567 bp (nt651 - nt1.217, M17527), für $G\alpha_2$ von 415 bp (nt743 - nt1.158, M17528), für $G\alpha_3$ von 588 bp (nt450 - nt1.038, M20713) und für $G\alpha_0$ von 585 bp (nt1.155 - nt1.740, M17526) (Abbildung 3.2.).

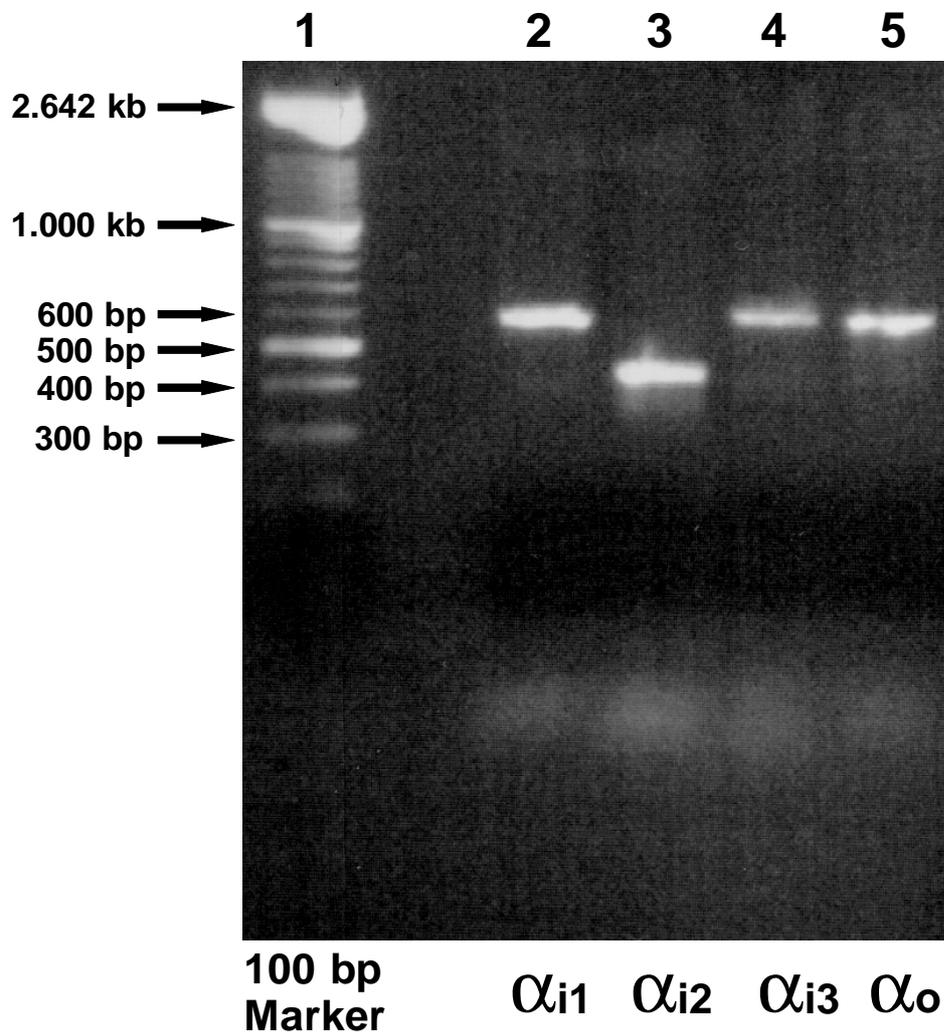


Abbildung 3.2.: Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten mit Hilfe der PCR

Spur 1: 100bp-Ladder, Spur 2: Produkt für $G\alpha_1$ (567 bp), Spur 3: Produkt für $G\alpha_2$ (415 bp), Spur 4: Produkt für $G\alpha_3$ (588 bp), Spur 5: Produkt für $G\alpha_0$ (585 bp)

3.1.1.2. Identifizierung der PCR-Produkte

Nach Amplifikation von $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ werden die cDNA-Fragmente mittels des QIAquick PCR-Isolation-Kit isoliert, über eine enzymatische Restriktionsanalyse in spezifische Fragmente gespalten und so identifiziert. $G\alpha 1$ wurde mit BglIII, $G\alpha 2$ mit NsiI, $G\alpha 3$ mit SacI und $G\alpha o$ mit BamHI geschnitten. Dadurch ergeben sich für $G\alpha 1$ die Fragmente 144 bp und 423 bp, für $G\alpha 2$ die Fragmente 139 bp und 276 bp, für $G\alpha 3$ die Fragmente 215 bp und 373 bp und für $G\alpha o$ Fragmente von 186 bp und 399 bp. Die Produkte der enzymatischen Restriktionsanalyse werden auf ein Metaphor-Agarosegel (2.5%) aufgetragen, um die geringen Unterschiede der geschnittenen Fragmentlängen besser zu verdeutlichen. Als Standard diente die 100bp Ladder (Abbildung 3.3.).

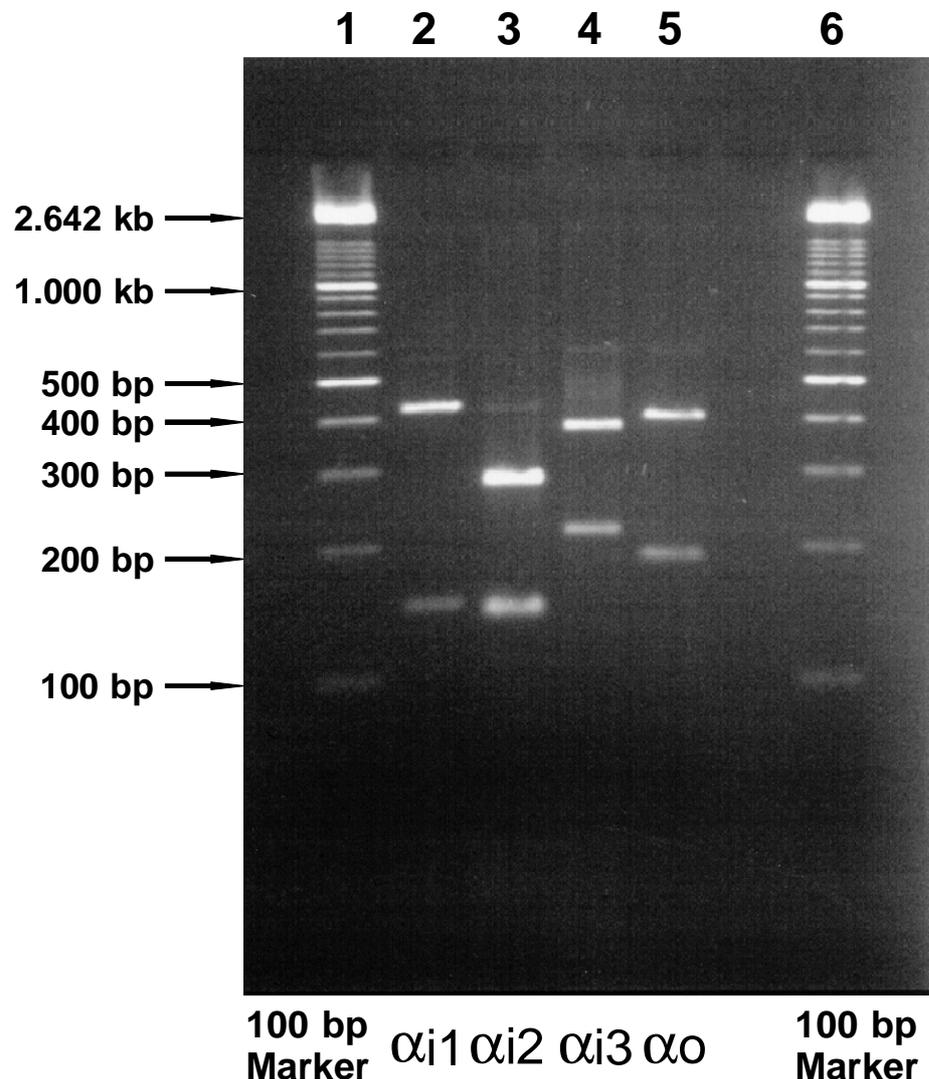


Abbildung 3.3.: Enzymatische Restriktionsanalyse der PCR-Produkte zur Identifizierung der G-Protein α -Untereinheiten

Spur 1: 100bp-Ladder, Spur 2: Fragment $G\alpha 1$ (576 bp, BglIII: 144 + 423 bp), Spur 3: Fragment $G\alpha 2$ (415 bp, NsiI: 139 + 276 bp), Spur 4: Fragment $G\alpha 3$ (588 bp, SacI: 215 + 373 bp), Spur 5: Fragment $G\alpha o$ (585 bp, BamHI: 186 + 393 bp), Spur 6: 100 bp-Marker

3.1.1.3. Sequenzierung der PCR-Produkte

Zusätzlich zur Identifizierung der PCR-Produkte durch enzymatische Restriktionsanalysen wurde die Basenfolge der vier Untereinheiten $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ über deren Sequenzierung bestätigt.

3.1.2. Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten auf Translationsebene

Nachdem die Existenz der Transkripte von G-Protein α -Untereinheiten über die PCR auf der Ebene der Genexpression in INS-1 Zellen nachgewiesen worden ist, wurde die Expression auf Proteinebene mit Hilfe der Westernblottechnik und der Immundetektion bestätigt. Dazu wurden $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ in Gesamtzellhomogenaten und partikulären Membranfraktionen aus INS-1 Zellen über spezifische Antikörper detektiert.

3.1.2.1. Nachweis mit Antikörpern (Biomol)

Nach Auftrennung der aus INS-1 Zellen gewonnenen partikulären Membranfraktionen in der SDS-PAGE und anschließender Immunodetektion im Westernblot zeigten sich im Molekulargewichtsbereich von 39 - 42 kD Signale mit gegen $G\alpha_1/G\alpha_2$, $G\alpha_3$ und gegen $G\alpha_3/G\alpha_o$ gerichteten Antikörpern. Die Signale für $G\alpha_1/G\alpha_2$ waren im Vergleich zu den Signalen gegen $G\alpha_3$ und $G\alpha_o$ sehr schwach und konnten auch bei Verwendung anderer Antikörper nicht detektiert werden (Abbildung 3.4.). Als unspezifische Negativkontrolle wurden partikuläre Membranfraktionen nur mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Analyse der unspezifischen Bindung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers lieferte nur ein schwaches Signal für ein unspezifisches Protein bei 50 kD, welches auch unterschiedlich stark durch die verschiedenen gegen die G-Protein α -Untereinheiten gerichteten Antikörper detektiert wurde (Abbildung 3.4. Spur 6).

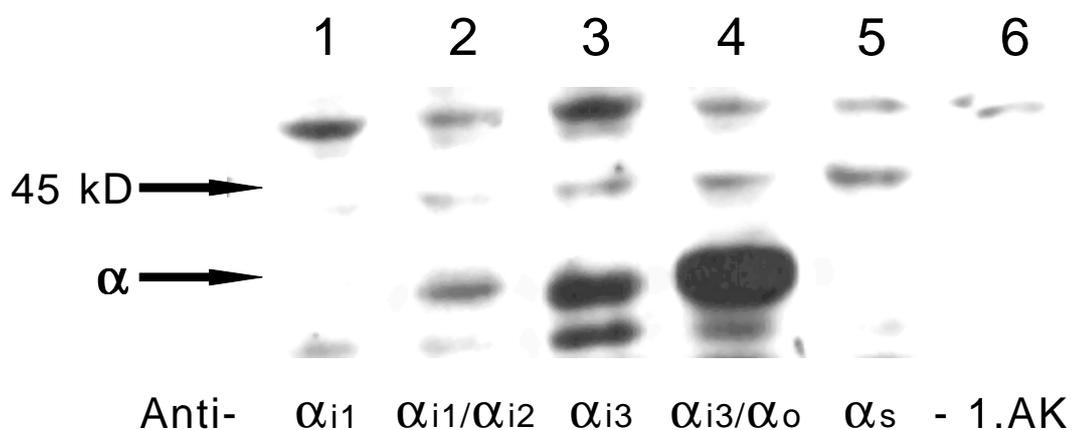


Abbildung 3.4.: Nachweis der Proteinexpression von $G\alpha_1$, $G\alpha_2$, $G\alpha_3$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_s$ (Biomol) Detektion der G-Protein α -Untereinheiten mit polyklonalen Antikörpern, Spur 1: $G\alpha_1$ (SA127), Spur 2: $G\alpha_1/G\alpha_2$ (SA128), Spur 3: $G\alpha_3$ (SA 129), Spur 4: $G\alpha_3/G\alpha_o$ (SA 130), Spur 5: $G\alpha_s$ (SA 131), Spur 6: ohne 1. Antikörper (Kontrolle der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers)

3.1.2.2. Nachweis mit Antikörpern (SCBT)

Zur Kontrolle der mit den Antikörpern der Firma Biomol erzielten Ergebnisse wurden 10 µg partikulärer Membranfraktion gegen 20 µl SDS6H Proteinstandardmarker auf ein 10%iges Acrylamid/Bisacrylamidgel aufgetragen.

Die Analyse mittels Immunodetektion ergab ein sehr schwaches Signal für Gαi1 und Gαs, starke Signale für Gαi3 und Gαo. Gαi2 war in den partikulären Membranfraktionen der INS-1 Zellen nicht nachweisbar. Zur Feststellung der unspezifischen Signale wurden partikuläre Membranfraktionen erneut nur mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper allein liefert kein Signal in den partikulären Membranfraktionen der INS-1 Zellen. Die unspezifischen Signale bei der Verwendung der spezifischen Antikörper entstehen durch den Auftrag hoher Proteinmengen.

Diese Ergebnisse zusammengefasst mit den Ergebnissen der Westernblots der Biomol-Antikörper lassen den Schluss zu, dass Gαi3 und Gαo in INS-1 Zellen deutlich exprimiert, Gαi1 und Gαi2 nicht oder nur schwach nachweisbar sind (Abbildung 3.5.).

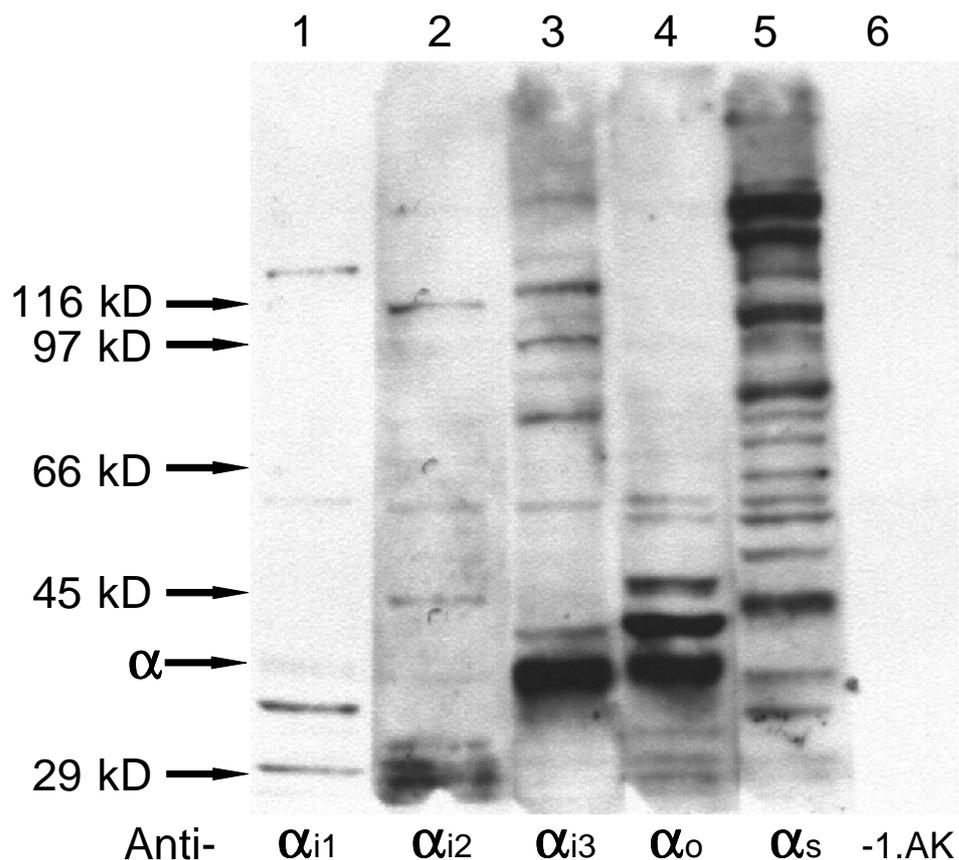


Abbildung 3.5.: Nachweis der Proteinexpression von Gαi1, Gαi2, Gαi3, Gαo und Gαs (SCBT)

Detektion der G-Protein α-Untereinheiten mit polyklonalen Antikörpern, Spur 1: Gαi1 (sc-391), Spur 2: Gαi2 (sc-7276), Spur 3: Gαi3 (sc-262), Spur 4: Gαo (sc-387), Spur 5: Gαs (sc-823), Spur 6: ohne 1. Antikörper (Kontrolle der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers)

3.1.2.3. Immuncytochemischer Nachweis der G-Proteine in INS-1 Zellen

Für den Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten mit Hilfe der Immuncytochemie wurden 100.000 INS-1 Zellen mit den gegen $G\alpha i1$ (sc-391), $G\alpha i2$ (sc-7276), $G\alpha i3$ (sc-262) und $G\alpha o$ (sc-387) gerichteten polyklonalen Antikörpern inkubiert. Nach Zugabe des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die Präparate bei Absorption 552 nm/Emission 565 nm im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.6.).

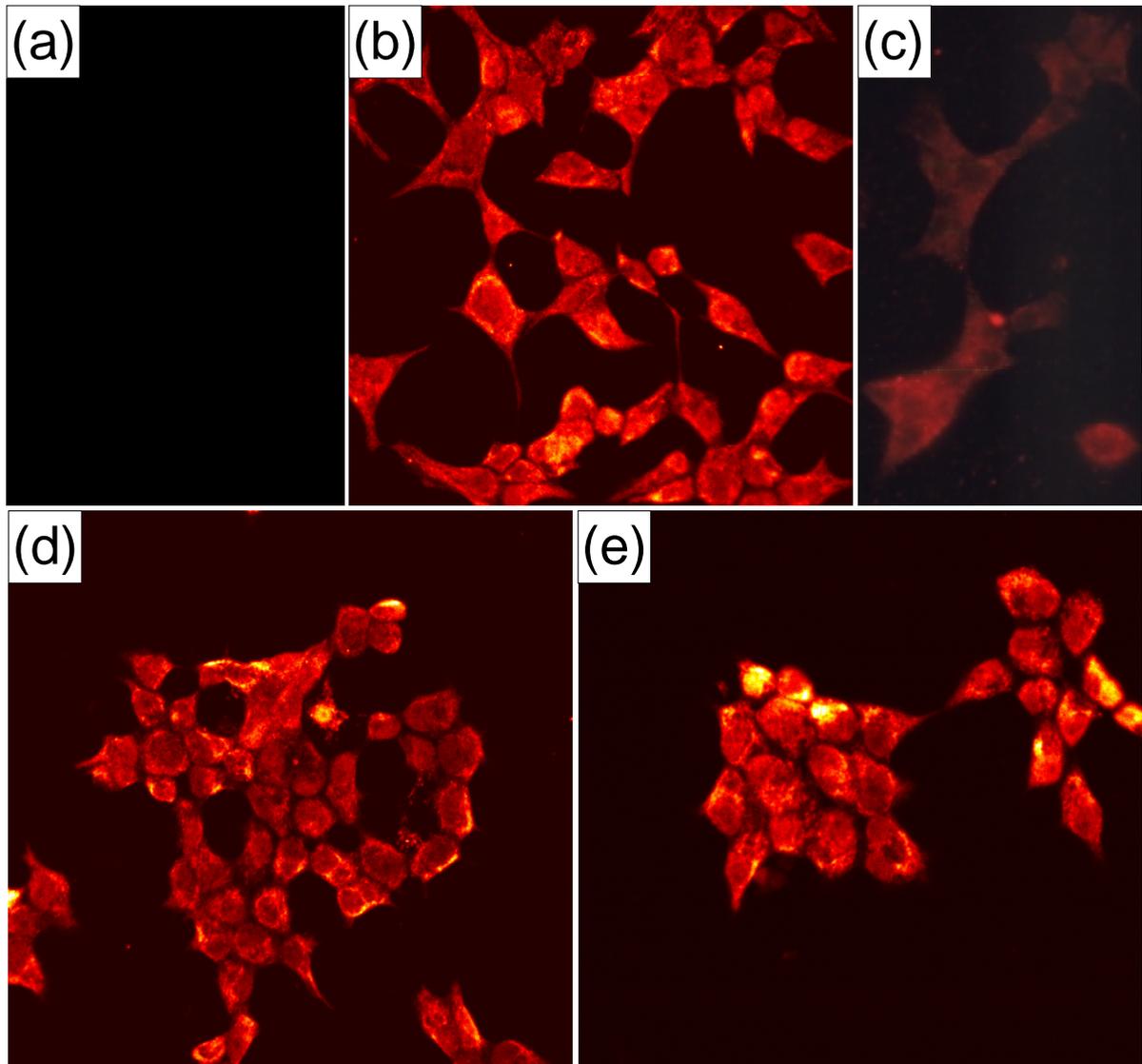


Abbildung 3.6.: Immuncytochemischer Nachweis von $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ in INS-1 Zellen
(a) Negativkontrolle ohne 1. Antikörper (b) $G\alpha i1$ -Antikörper (c) $G\alpha i2$ -Antikörper (d) $G\alpha i3$ -Antikörper
(e) $G\alpha o$ -Antikörper. Die gelbe Fluoreszenz (d, e) der mit den spezifischen Antikörpern behandelten INS-1 Zellen entspricht einer sehr starken Bindung der Antikörper und damit einer starken Expression der $G\alpha$ -Untereinheit. Mit $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ inkubierte Zellen weisen teilweise eine gelbe Fluoreszenz auf, was einer starken Expression dieser beiden Untereinheiten in INS-1 Zellen entspricht. Die rote Fluoreszenz entspricht ebenfalls einer starken, wenn auch geringeren Expression als bei der gelben Fluoreszenz. Die rote Fluoreszenz weist die starke Expression der $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ nach (b, d, e). $G\alpha i2$ zeigt nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Diese experimentellen Befunde bestätigten die Ergebnisse der Immunodetektion im Westernblot.

Die Analyse der Ergebnisse zeigt verschieden starke und verschiedenfarbige Fluoreszenzen: Man unterscheidet gelb, rot und schwach rot fluoreszierende Zellbereiche. Die gelbe Fluoreszenz verschiedener Zellbereiche deutet auf eine sehr starke Bindung des spezifischen Primärantikörpers und damit auf eine dementsprechend starke Expression des Antigens (G α -Untereinheit) in diesen Bereichen hin. Dies ist bei INS-1 Zellen zu beobachten, die mit gegen G α i3 und G α o gerichteten Antikörpern behandelt wurden (Abbildung 3.6.d, 3.6.e). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass diese G α -Untereinheiten in INS-1 Zellen am stärksten exprimiert werden. Intensiv rot fluoreszierende Bereiche weisen auch auf eine starke Expression der jeweiligen G α -Untereinheiten hin. Die intensiv rote Fluoreszenz kann bei den G α -Untereinheiten G α i3 und G α o gezeigt werden (Abbildung 3.6.d, 3.6.e). Schwach bis dezent rot fluoreszierende Bereiche deuten auf eine schwache Bindung des Primärantikörpers, in diesem Fall G α i1 und G α i2. G α i1 kann nur schwach detektiert werden (Abbildung 3.6.b). G α i2 ist mit den verwendeten Antikörpern nicht nachweisbar, liegt unterhalb der Nachweisgrenze oder ist in INS-1 Zellen nicht vorhanden (Abbildung 3.6.c). Die Ergebnisse der immunocytochemischen Experimente stimmen mit den Ergebnissen, die bei der Immunodetektion im Westernblot erzielt werden konnten, überein.

3.2. Etablierung von G-Protein-Antisense INS-1 Mischzellklonen

3.2.1. Subklonierung der PCR-Produkte in pCR2.1TOPO

Nach dem Nachweis von G α i1, G α i3 und G α o in INS-1 Zellen sollen diese unabhängig und spezifisch voneinander reprimiert werden. Da G α i2 nicht auf Proteinebene, aber auf der Transkriptionsebene in der Insulinomazelllinie nachgewiesen werden konnte, wurde sie in die weiteren Antisense-Experimente mit einbezogen.

Die über die PCR amplifizierten cDNA-Fragmente von G α i1, G α i2, G α i3 und G α o (G α i1 - 567 bp, G α i2 - 415 bp, G α i3 - 588 bp und G α o - 585 bp) wurden zunächst in den pCR2.1TOPO Vektor subkloniert. Der Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO wurde verwendet, da er den mit einer Topoisomerase aktivierten 5'-Thymin-Überhang in der MCS besitzt. Bei der Verwendung der TAQ-Polymerase entstehen PCR-Produkte mit 3'-Deoxy-Adenin-Überhängen. Durch die Verwendung des pCR2.1TOPO-Vektors mit der bereits gebundenen aktivierten Topoisomerase wird die Ligation der synthetisierten PCR-Produkte erleichtert.

Diese DNA-Abschnitte wurden anschließend aus dem Subklonierungsvektor gezielt in Sense- und Antisense-Orientierung downstream des EGFP-Gens in den Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 kloniert (Abbildung 3.7.).

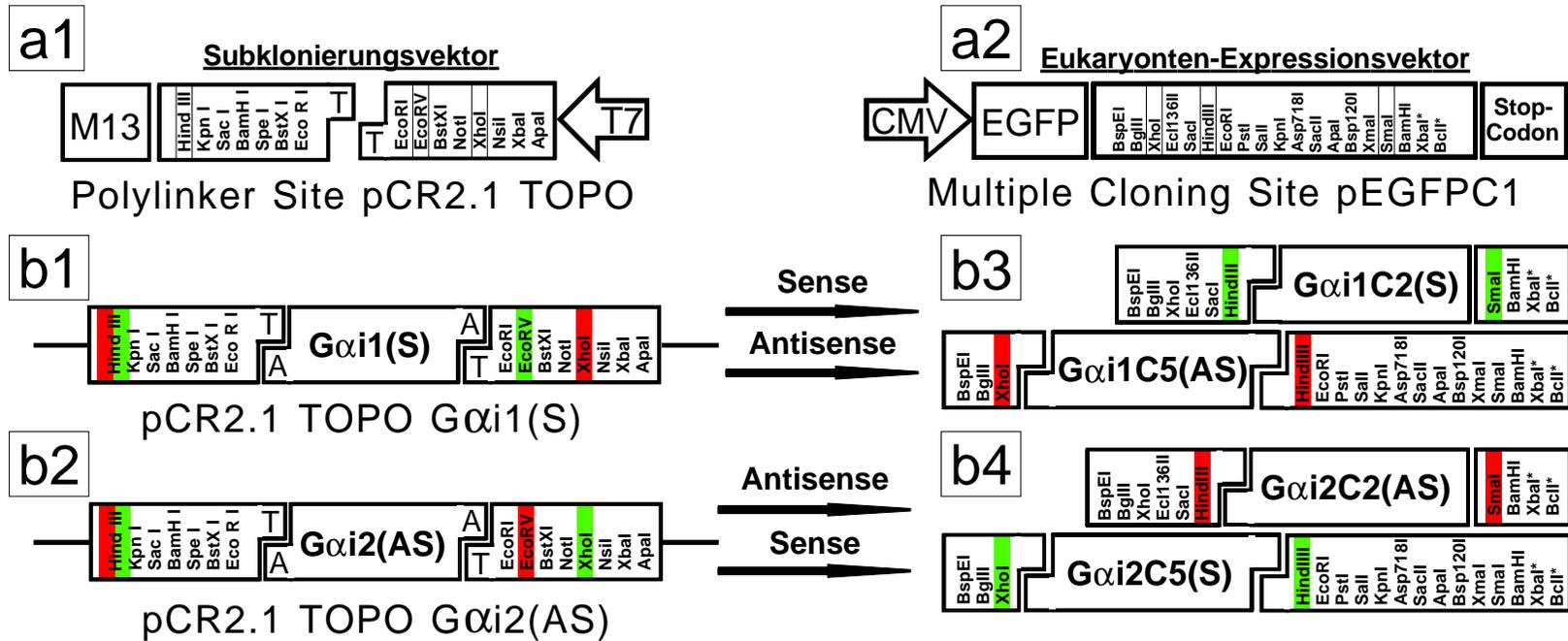


Abbildung 3.7.: Klonierung der Sense/Antisense-Vektoren

Abbildung 3.7.a1 - 2: Polylinkersite und Multiple Cloning Site (MCS) des Subklonierungs- (pCR2.1TOPO) und Eukaryontenexpressionsvektors (pEGFPC1)
 Nach Subklonierung der PCR-Fragmente in die Polylinkersite des pCR2.1TOPO-Vektors (links) wurden die Existenz und die Orientierung der Fragmente über spezifische Restriktionsanalysen nachgewiesen. Es ergab sich für das Gαi1-Fragment ein Vektor pEGFPC1Gαi1 mit der Sense-Orientierung zur M13-Reverse Priming Site, für die Fragmente Gαi2, Gαi3 und Gαo ergaben sich die Vektoren pEGFPC1Gαi2, pEGFPC1Gαi3 und pEGFPC1Gαo jeweils mit den Fragmenten in der Antisense-Orientierung zur M13-Reverse Priming Site. Die Fragmente wurden anschließend durch spezifisch gewählte Schnittstellen downstream des EGFP-Gens in Sense- und Antisense-Orientierung in die MCS (rechts) des pEGFPC1-Vektors kloniert.

Abbildung 3.7.b1 - 4: Klonierung der Gαi/o-Fragmente in den Expressionsvektor pEGFPC1

Das in Sense-Orientierung vorhandene Gαi1-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRV aus dem pCR2.1TOPO-Vektor herausgetrennt und über die Schnittstellen HindIII und SmaI downstream des EGFP-Gens in die MCS des pEGFPC1-Vektors ligiert. Dadurch ergab sich der Sense-Vektor pEGFPC1Gαi1C2S; die Orientierung wurde beibehalten. Durch die Verwendung der Restriktionsenzyme Hind III und XhoI und der anschließenden Klonierung in die MCS des pEGFPC1-Vektors entstand der Antisense-Vektor pEGFPC1Gαi1C5as; die Orientierung wurde in die „Antisense-Richtung“ geändert. Die Fragmente Gαi2, Gαi3 und Gαo waren in Antisense-Orientierung zur M13-Reverse Priming Site im pCR2.1TOPO-Vektor vorhanden. Durch die Klonierung über die Restriktionsstellen HindIII/EcoRV und (SmaI) entstanden die Antisense-Vektoren pEGFPC1Gαi2C2as, pEGFPC1Gαi3C4as und pEGFPC1GαoC5as; die Klonierung der Fragmente über HindIII und XhoI führte zur Umkehr der Orientierung. Es entstanden die Sense-Konstrukte pEGFPC1Gαi2C5s, pEGFPC1Gαi3c8s und pEGFPC1GαoC9s. Durch gezieltes Klonieren der Gαi/o-Fragmente entstanden so aus einer Orientierung im Subklonierungsvektor die Sense-/Antisense-Orientierungen im Eukaryonten-Expressionsvektor. M13: M13-Reverse Priming Site, T7: T7-Promotor, CMV: Cytomegalovirus-Promoter, SmaI und EcoRV wurden durch die Klonierungen zerstört.

3.2.2. Enzymatische Analyse der Orientierung in pCR2.1TOPO

Nach Ligation der Fragmente der G-Protein α -Untereinheiten wurden Restriktionsanalysen zum Nachweis der Insertion und Orientierung des DNA-Fragmentes durchgeführt. Die Restriktionsanalysen, die die Existenz der PCR-Produkte bestätigen sollen, erfolgten mit dem die Polylinkersite flankierenden Enzym EcoRI. Außerdem wurden zur Feststellung der Orientierung die Konstrukte unter Verwendung unterschiedlicher Enzymkombinationen analysiert: Für den Klon pCR2.1TOPOG α i1 ergibt sich eine 5'-3'-Orientierung (Sense-Orientierung) und für die Klone pCR2.1TOPOG α i2, pCR2.1TOPOG α i3 und pCR2.1TOPOG α o jeweils eine 3'-5'-Orientierung (Antisense-Orientierung) zur M13 Reverse Priming Site (Abbildung 3.8.a, 3.8.b).

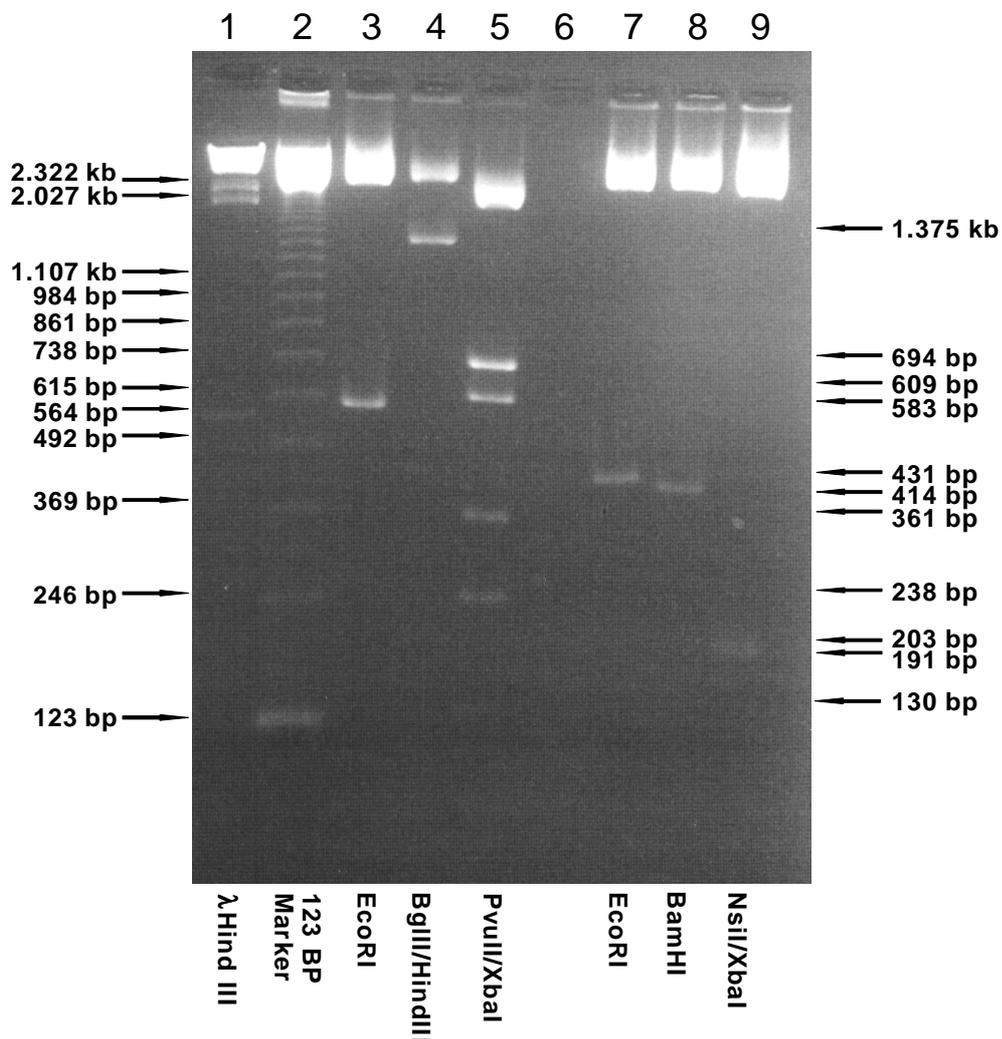


Abbildung 3.8.a: Enzymatische Analyse der Vektoren pCR2.1TOPOG α i1 und pCR2.1TOPOG α i2
Die Konstrukte pCR2.1TOPOG α i1 und pCR2.1TOPOG α i2 wurden auf Insertion der DNA-Fragmente und deren Orientierung mit spezifischen Restriktionsenzymen analysiert. Spur 1: λ Hind III Marker, Spur 2: 123bp-Marker, Spur 3 + 7: EcoRI-Analyse der Vektoren pCR2.1TOPOG α i1 und pCR2.1TOPOG α i2. Die Analyse zeigt, dass die Untereinheiten G α i1 und G α i2 in den Vektoren enthalten sind. Spur 4, 5, 8, 9: Restriktionsanalysen mit Enzymen, welche die Orientierung des PCR-Produktes im Vektor zeigen sollen, identifizieren den pCR2.1TOPOG α i1 als Vektor in dem das PCR-Produkt in Sense- und den pCR2.1TOPOG α i2 als Vektor in dem das PCR-Produkt in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site vorhanden ist.

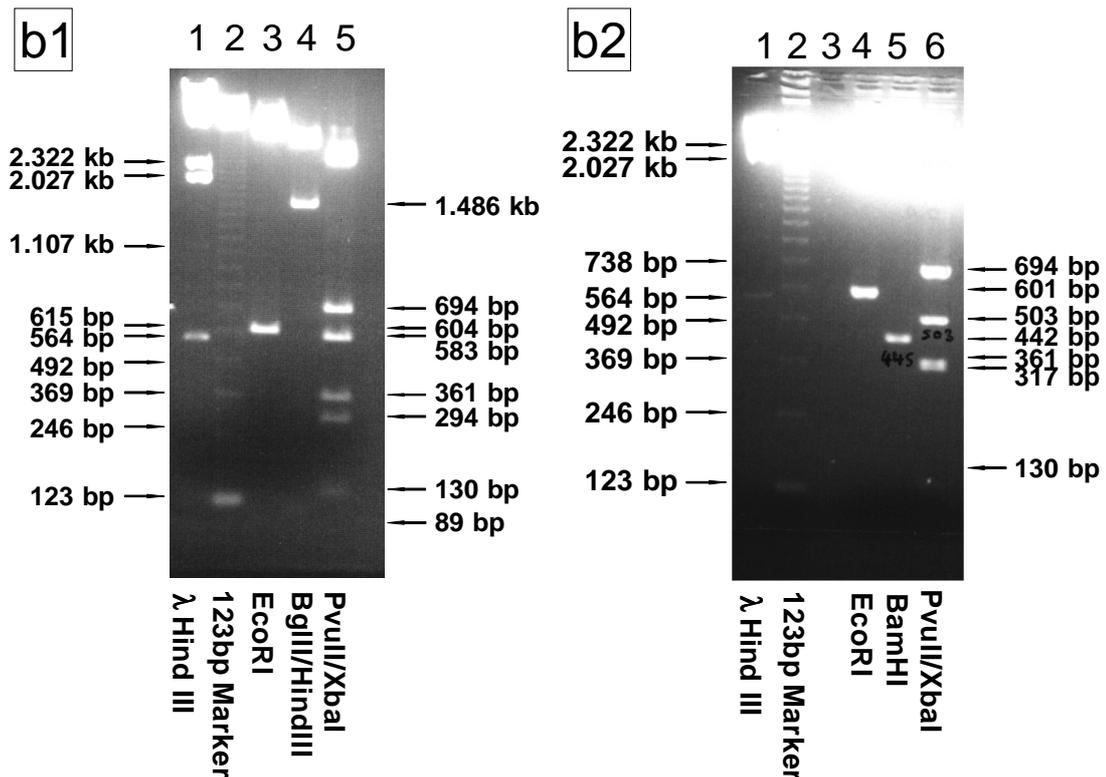


Abbildung 3.8.b: Enzymatische Analysen der Klone pCR2.1TOPOG α i3 und pCR2.1TOPOG α Die Konstrukte pCR2.1TOPOG α i3 und pCR2.1TOPOG α wurden auf Insertion der DNA-Fragmente und deren Orientierung mit spezifischen Restriktionsenzymen analysiert. Die pCR2.1TOPO-Klone wurden mit EcoRI, welches im pCR2.1TOPO-Vektor flankierend das Insert schneidet, auf die Existenz des PCR-Produktes überprüft. Zur Feststellung der Orientierung wurden jeweils zwei verschiedene enzymatische Restriktionsanalysen angewandt.

b1: Analysen des Klons pCR2.1TOPOG α i3, Spur 1: λ HindIII-Marker, Spur 2: 123bp-Marker, Spur 3: EcoRI-Restriktionsanalyse, die Analyse zeigt die Existenz des PCR-Produktes G α i3 im Vektor, Spur 4: Restriktionsanalyse mit BglII/HindIII, die Analyse zeigt, dass sich das PCR-Produkt G α i3 in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site im pCR2.1TOPO-Vektor befindet, Spur 5: Restriktionsanalyse mit PvuII/XbaI, Bestätigung der Antisense-Orientierung der BglII/HindIII-Restriktionsanalyse

b2: Analysen des Klons pCR2.1TOPOG α , Spur 1: λ HindIII-Marker, Spur 2: 123bp-Marker, Spur 3: Blank, Spur 4: EcoRI-Restriktionsanalyse, die Analyse zeigt die Existenz des PCR-Produktes G α im Vektor, Spur 5: Restriktionsanalyse mit BglII/HindIII, die Analyse zeigt, dass sich das PCR-Produkt G α in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site im pCR2.1TOPO-Vektor befindet, Spur 6: Restriktionsanalyse mit PvuII/XbaI, Bestätigung der AS-Orientierung der BglII/HindIII-Restriktionsanalyse

3.2.3. Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pEGFPC1

Die Klonierung der PCR-Fragmente in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFPC1 erfolgte über Öffnung des Vektors mit den Enzymen HindIII/SmaI bzw. HindIII/XhoI (Abbildung 3.7.a). Die G α i1-, G α i2-, G α i3- und G α -Fragmente werden downstream des EGFP-Gens an das 3'-Ende vor das Stopkodon inkloniert. Dazu werden die jeweiligen Fragmente aus den pCR2.1TOPO-Vektor über HindIII/EcoRV bzw. HindIII/XhoI ausgeschnitten (Abbildung 3.7.a1) und in den Vektor pEGFPC1 in die MCS einligiert (Abbildung 3.7.a2). Die Orientierung der jeweiligen G-Protein α -Fragmente wird dabei durch die Umklonierung über HindIII/EcoRV(SmaI) beibehalten und über HindIII/XhoI umgekehrt. Das G α i1-Fragment wird über HindIII/EcoRV(SmaI) in Sense-Orientierung (S) und über

HindIII/XhoI in Antisense-Orientierung (AS) einkloniert (Abbildung 3.7.b1 - 2), die erhaltenen Klone wurden als pEGFPC1G α i1C2s und pEGFPC1G α i1C5as bezeichnet. Das Fragment G α i2 wurde, ebenso wie G α i3 und G α o, über HindIII/XhoI in Sense-Orientierung (pEGFPC1G α i2C5S, pEGFPC1G α i3C8S, pEGFPC1G α oC9S) und über HindIII/EcoRV(SmaI) in Antisense-Orientierung (pEGFPC1G α i2C2AS, pEGFPC1G α i3C4AS, pEGFPC1G α oC5AS) kloniert (Abbildung 3.7.b3 - 4). Die erhaltenen Klone werden also im folgenden mit dem Anhang „S“ (Sense) oder „AS“ (Antisense) im Wortstamm des Konstruktnamens bezeichnet (Tabelle 3.2.).

Subklonierungsvektor	umklontiert über	Zielvektor	Sense-/Antisense-Konstrukte
pCR2.1TOPOG α i1S	HindIII/EcoRV-SmaI HindIII/XhoI	pEGFPC1	pEGFPC1G α i1C2S pEGFPC1G α i1C5AS
pCR2.1TOPOG α i2AS	HindIII/EcoRV-SmaI HindIII/XhoI	pEGFPC1	pEGFPC1G α i2C2AS pEGFPC1G α i2C5S
pCR2.1TOPOG α i3AS	HindIII/EcoRV-SmaI HindIII/XhoI	pEGFPC1	pEGFPC1G α i3C4AS pEGFPC1G α i3C8S
pCR2.1TOPOG α oAS	HindIII/EcoRV-SmaI HindIII/XhoI	pEGFPC1	pEGFPC1G α oC5AS pEGFPC1G α oC9S

Tabelle 3.2.: Umklonierung der PCR-Produkte aus pCR2.1TOPO in pEGFPC1

Die Restriktionsenzyme HindIII und XhoI produzieren bei Behandlung sogenannte klebrige Enden (Sticky Ends) mit einem Überhang, EcoRV und SmaI produzieren glatte Enden ohne Überhang (Blunt Ends); bei der Ligation mit HindIII/EcoRV-SmaI bleibt die Orientierung der DNA-Fragmente im Zielvektor erhalten; die Klonierung über HindIII/XhoI führt zur Umkehr der Orientierung der DNA-Fragmente im Zielvektor pEGFPC1. SmaI und EcoRV sind Restriktionsenzyme, welche bei Behandlung von DNA Blunt Ends hinterlassen und werden deshalb auch als Blunt End Cutter bezeichnet. Blunt End DNA-Fragmente können dann ungeachtet des verwendeten Enzyms miteinander ligiert werden.

Durch die Ligation der G α -Fragmente downstream des EGFPs entsteht bei der Transkription eine EGFP-Sense- bzw. EGFP-Antisense-Fusions-mRNA. Die partielle Translation der EGFP-Antisense-Fusions-mRNA resultiert in einem fluoreszierenden EGFP-Antisense-Fusionsprotein, welches als Marker - als Reporter - und somit als Beweis für deren Expression dient. Parallel dazu führt die Expression einer EGFP-Antisense-Fusions-mRNA nach Hybridisierung mit der Ziel-mRNA zur Repression des Zielproteins.

3.2.4. Nachweis der Sense-/Antisense-Fragmente im Vektor pEGFPC1

Nach Ligation der G-Protein-Fragmente in den Vektor pEGFPC1 wurde der erfolgreiche und korrekte Einbau der Sense-/Antisense-Fragmente über eine EcoRI-Restriktionsanalyse überprüft (Abbildung 3.9.). Da bei der Klonierung der Fragmente die Orientierung durch die verwendeten Restriktionsenzyme HindIII/EcoRV(SmaI) bzw. HindIII/XhoI festgelegt wurde (Abbildung 3.7.), muss die endgültige Orientierung im Zielvektor pEGFPC1 nicht mehr erneut untersucht werden. Die Orientierung der Fragmente wurde bereits durch die spezifischen Analysen nach der Subklonierung festgestellt (Abbildung 3.8.a, 3.8.b). Die erwarteten Fragmentlängen lagen für die Vektoren pEGFPC1G α i1C2S und pEGFPC1G α i1C5AS bei 4.785 kb/4.806 kb und 583 bp, für pEGFPC1G α i2C2AS und pEGFPC1G α i2C5S bei 4.758 kb/4.806 kb und 431 bp, für pEGFPC1G α i3C4AS und pEGFPC1G α i3C8S bei 4.758 kb/4.806 kb und 604 bp und für pEGFPC1G α oC5AS und pEGFPC1G α oC9S bei 4.758 kb/4.806 kb und 601 bp.

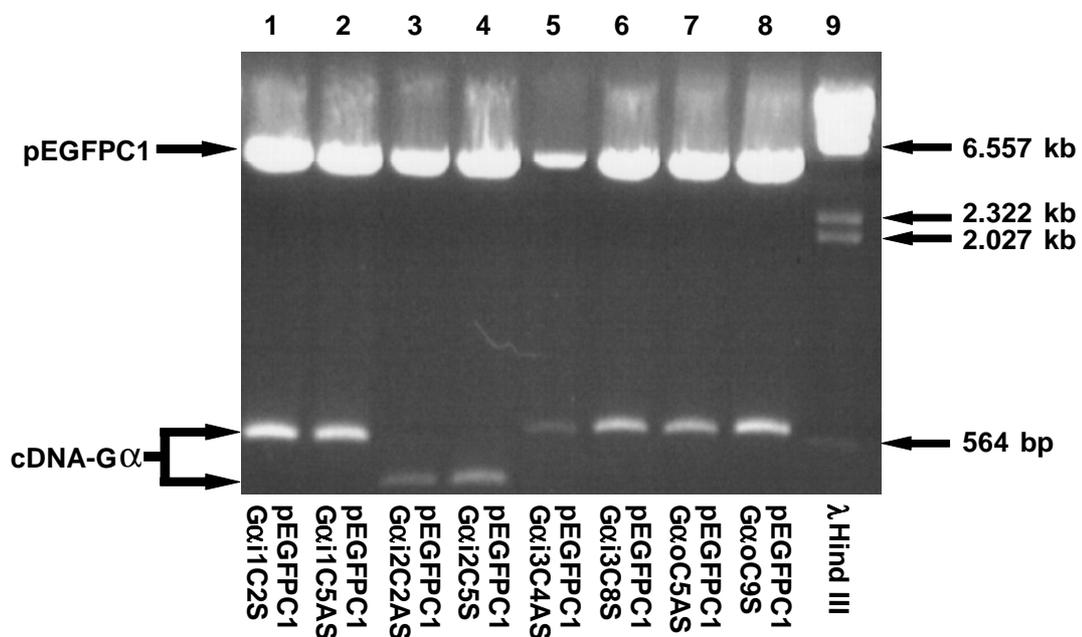


Abbildung 3.9.: Nachweis der G α i1-, G α i2-, G α i3- und G α o-Inserts im Vektor pEGFPC1
Enzymatische Restriktionsanalyse mit EcoRI. Die Inserts wurden über die flankierenden 5'- und 3'-EcoRI Schnittstellen aus dem Konstrukt herausgeschnitten und deren Existenz im Vektor pEGFPC1 so nachgewiesen.

Spur 1: pEGFPC1G α i1C2S (583 bp), Spur 2: pEGFPC1G α i1C5AS (583 bp), Spur 3: pEGFPC1G α i2C2AS (431 bp), Spur 4: pEGFPC1G α i2C5S (431 bp), Spur 5: pEGFPC1G α i3C4AS (604 bp), Spur 6: pEGFPC1G α i3C8AS (604 bp), Spur 7: pEGFPC1G α oC5AS (601 bp), Spur 8: pEGFPC1G α oC9S (601 bp), Spur 9: λ Hind III Marker

3.3. Analyse transient transfizierter INS1-Mischzellklone

3.3.1. Transfektion von INS-1 Zellen und Ermittlung der Transfektionsrate

INS-1 Zellen wurden mit den hergestellten Antisense-Konstrukten durch Elektroporation transient transfiziert. Die Transfektionsrate wurde über die Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt: pEGFPC1 transfizierte INS-1 Zellen wurden 2 - 7 Tage nach Transfektion trypsiniert und das Verhältnis von fluoreszierenden Zellen zur Gesamtzahl

der INS-1 Zellen wurde ermittelt. Es ergab sich eine Transfektionsrate bei pEGFPC1 transfizierten INS-1 Zellen von 30%. Die Expression der mRNA der pEGFPC1G α -Fusions-Konstrukte war nach 1 – 2 Tagen über die Translation des EGFP-S- bzw. EGFP-AS-Fusionsproteins und der damit verbundenen Fluoreszenz des EGFP zu beobachten (Abbildung 3.10.). Da es sich bei den transfizierten INS-1 Zellen um eine Mischung aus fluoreszierenden EGFP- positiven und nicht fluoreszierenden Zellen handelt, werden diese im weiteren Verlauf als INS-1 Mischzellklone bezeichnet.

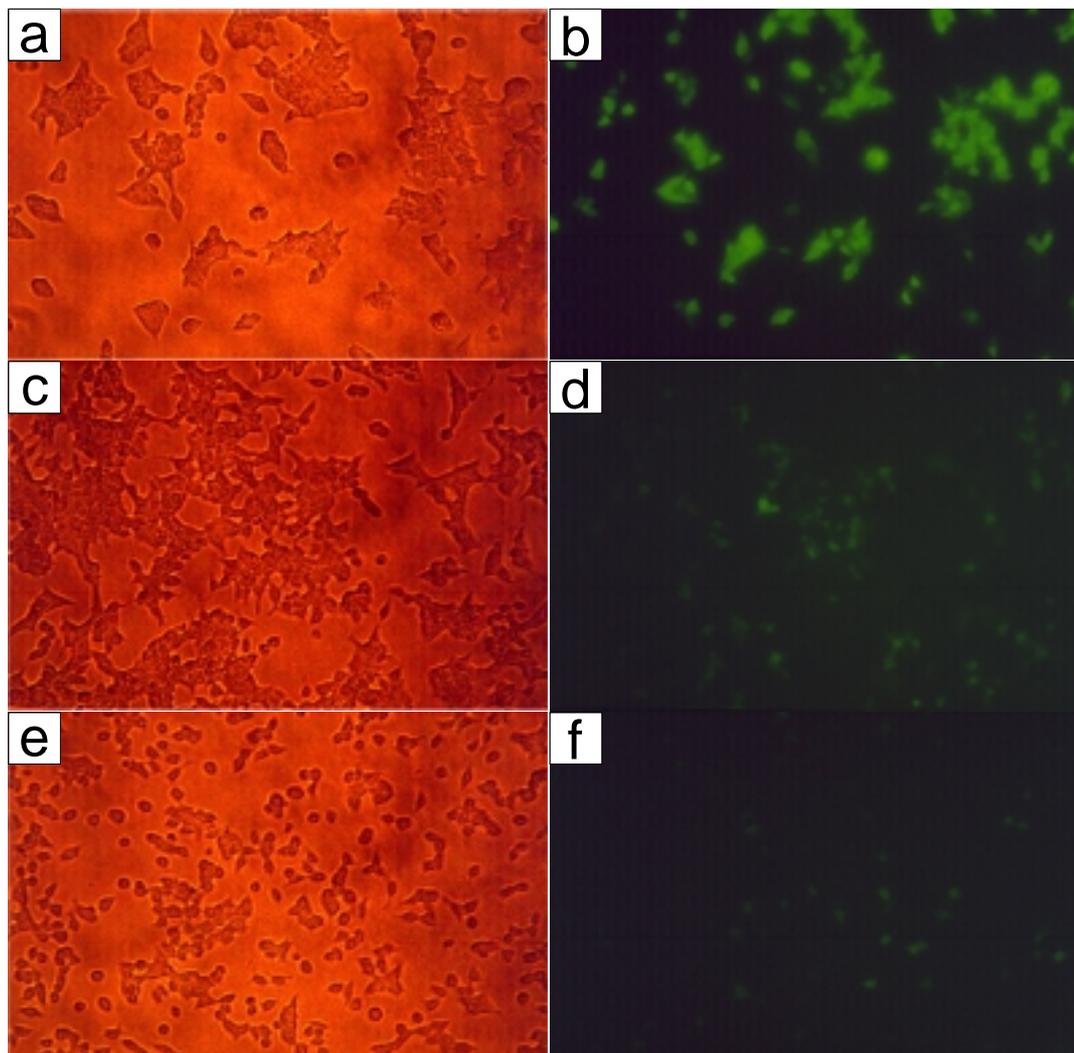


Abbildung 3.10.: Ermittlung der Transfektionsrate bei pEGFPC1-INS-1 Mischzellklonen
 INS-1 Zellen wurden nach der Transfektion mit den verschiedenen Konstrukten im Durchlicht und unter Fluoreszenzlicht gezählt und die Rate der fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl ermittelt. Es ergab sich bei Zellen mit pEGFPC1 transfizierten Zellen nach 2 Tagen eine Transfektionsrate von 30%. Dargestellt sind 2 Tage alte INS-1 Mischzellklone, welche mit dem Vektor pEGFPC1 und den Konstrukten pEGFPC1G α i2C2AS und pEGFPC1G α i3C4AS transfiziert worden waren. (a) pEGFPC1 transfizierte INS-1 Mischzellklone im Durchlicht (b) Fluoreszenz der pEGFPC1 transfizierten INS-1 Zellen (c) pEGFPC1G α i2C2AS transfizierte INS-1 Mischzellklone im Durchlicht (d) Fluoreszenz der pEGFPC1G α i2C2AS transfizierten INS-1 Zellen (e) pEGFPC1G α i3C4AS transfizierte INS-1 Mischzellklone im Durchlicht (f) Fluoreszenz der pEGFPC1G α i3C4AS transfizierten INS-1 Zellen.

3.3.2. Fluoreszenznachweis der transient transfizierten INS-1 Mischzellklone

Nach Ermittlung der Transfektionsrate wurden INS-1 Zellen mit den verschiedenen Sense-/ Antisense-Konstrukten pEGFPC1G α i1C2S, pEGFPC1G α i1C5AS, pEGFPC1G α i2C2AS, pEGFPC1G α i2C5S, pEGFPC1G α i3C4AS, pEGFPC1G α i3C8S, pEGFPC1G α oC5AS und pEGFPC1G α oC9S transfiziert. Abbildung 3.11. zeigt transient transfizierte INS-1 Mischzellklone, deren Fluoreszenz bereits nach 2 Tagen sichtbar war.

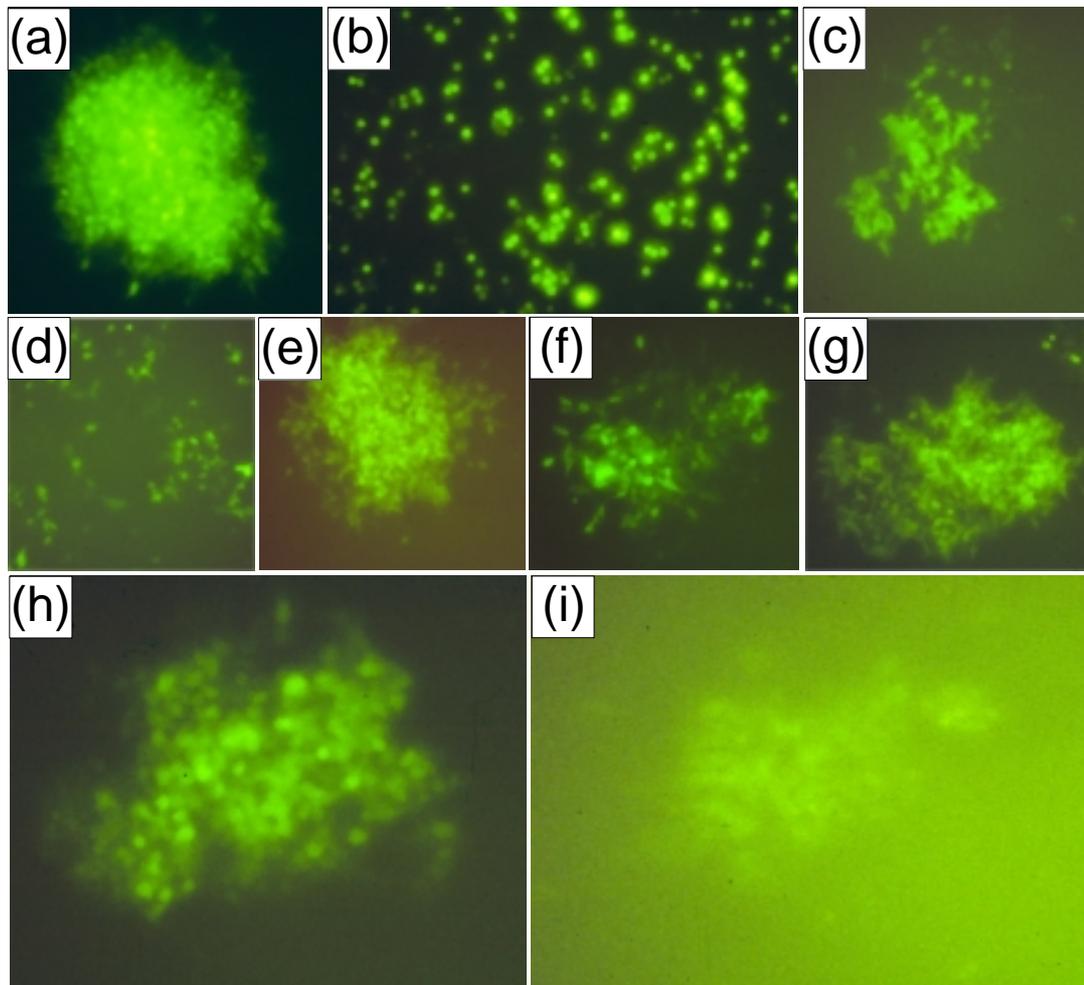


Abbildung 3.11.: EGFP-Fluoreszenz transient transfizierter INS-1 Mischzellklone
INS-1 Zellen wurden über Elektroporation mit dem Vektor pEGFPC1 und den Konstrukten pEGFPC1G α i1C2S, pEGFPC1G α i1C5AS, pEGFPC1G α i2C2AS, pEGFPC1G α i2C5S, pEGFPC1G α i3C4AS und pEGFPC1G α i3C8S transient transfiziert. Gezeigt sind transient transfizierte INS-1 Mischzellklone 2 Tage nach der Transfektion sowie 2-4 Wochen nach G418-Selektion. (a) pEGFPC1 2 Wochen nach Transfektion (b) pEGFPC1 2 Tage nach Transfektion (c) pEGFPC1G α i1C5AS (d) pEGFPC1G α i2C2AS (e) pEGFPC1G α i2C2AS (f) pEGFPC1G α i2C5S (g) pEGFPC1G α i2C5S (h) pEGFPC1G α i3C4AS (i) pEGFPC1G α i3C8S. INS-1 Mischzellen in Abbildung 3.11.b 2-3 d nach Transfektion alle übrigen Abbildungen 2-4 Wochen nach G418-Selektion. Mischzellklone der mit pEGFPC1G α i1C2S, pEGFPC1G α oC5AS und pEGFPC1G α oC9S transfizierten INS-1 Zellen sind wegen fehlender Fluoreszenz nicht abgebildet

Die Mischzellklone mit den verschiedenen Konstrukten wiesen eine unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz auf, die stärkste Fluoreszenz zeigten INS-1 Mischzellklone, die mit dem leeren, kein Sense-/Antisense-Fragment enthaltenden, pEGFPC1-Vektor transfiziert

worden waren. INS-1 Zellen, die transient mit Konstrukten gegen $G\alpha i3$ transfiziert wurden, wiesen die schwächste Fluoreszenz auf. Mischzellklone, welche mit pEGFPC1 $G\alpha i1C2S$, pEGFPC1 $G\alpha oC5AS$ oder pEGFPC1 $G\alpha oC9S$ transfiziert worden waren, wiesen keine Fluoreszenz auf.

3.4. Quantifizierung des G-Proteingehaltes in transfizierten

INS-1 Mischzellklonen

Eine Woche nach Transfektion der INS-1 Zellen mit den gegen $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ gerichteten Antisense-Konstrukten wurden die Zellen durch Zugabe des Antibiotikums Geneticin (G418) zum Medium für 2 - 4 Wochen selektioniert, anschließend als partikuläre Membranfraktionen (mittels der subzellulären Fraktionierung) für die proteinbiochemische Quantifizierung aufbereitet und mit gegen die G-Protein α -Untereinheiten gerichteten, polyklonalen Primärantikörper (SCBT) im Westernblot analysiert. Zur quantitativen Bestimmung des G-Proteingehaltes der transfizierten Zellen wurden Proben $G\alpha i$ -Antisense-transfizierter Zellen mit Proben pEGFPC1-transfizierter INS-1 Kontrollmischklone verglichen. Zusätzlich wurde die Probe pEGFPC1-transfizierter Zellen und die Probe $G\alpha iAS$ -transfizierter INS-1 Mischzellklone aufgetragen, um die durch die unspezifische Bindung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers hervorgerufenen Signale festzustellen.

3.4.1. Quantifizierung der $G\alpha i1$ -Untereinheit in $G\alpha i1$ -Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Der quantitative Vergleich der mit pEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$ transient transfizierten INS-1 Mischzellklone ist in Abbildung 3.12. dargestellt: Spur 1 - 3 zeigt die Signale für $G\alpha i1$ in den pEGFPC1-transfizierten Zellen und Spur 4 - 6 die Signale für $G\alpha i1$ in pEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$ -transfizierten INS-1 Mischzellklonen.

Spuren 7 und 8 zeigen die unspezifischen Signale des Sekundärantikörpers. Das spezifische Signal für $G\alpha i1$ lag nahe der 45 kD-Bande des Molekulargewichtsmarkers. Die quantitative Analyse zeigte beim Vergleich der Kontrolle pEGFPC1 transfizierter INS-1 Kontrollmischzellen mit pEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$ transfizierten $G\alpha i1AS$ -INS-1 Mischzellklonen kein reduziertes Proteinsignal im Bereich von 39 - 42 kD und somit auch keine reduzierte Proteinexpression des $G\alpha i1$.

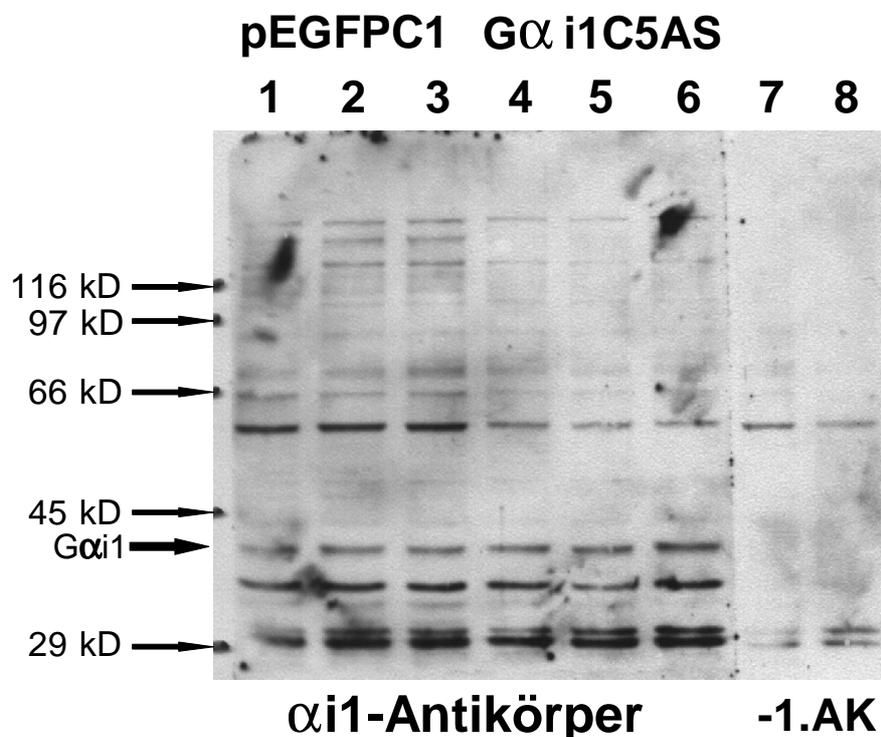


Abbildung 3.12.: Quantifizierung des $G\alpha i1$ -Proteingehaltes in pEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$ transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Spur 1 - 3, 7: 20 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 transient transfizierter INS-1 Mischklone, Spur 4 - 6, 8: 20 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$ transient transfizierter INS-1 Mischklone, Spur 1 - 6 wurden mit dem spezifisch gegen $G\alpha i1$ gerichteten Antikörper Spuren 7 und 8 jeweils zur Kontrolle ohne den primären Antikörper inkubiert. Eine Repression der $G\alpha i1$ -Untereinheit war nicht zu detektieren.

3.4.2. Quantifizierung der $G\alpha i2$ -Untereinheit in $G\alpha i2$ -Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Der quantitative Vergleich der mit pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS transient transfizierten INS-1 Mischzellklone ist in Abbildung 3.13. dargestellt. In Spur 1-3 wurden pEGFPC1 transfizierte INS-1 Kontrollmischzellen aufgetragen, Spur 4 - 6 zeigt pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS transfizierte INS-1 Mischzellklone. Spur 1 - 6 wurde mit dem spezifisch gegen $G\alpha i2$ gerichteten polyklonalen Antikörper inkubiert, Spur 7 und 8 (Spur 7: pEGFPC1 transfizierte INS-1 Zellen, Spur 8: pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS transfizierte INS-1 Zellen) als Kontrolle nur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Spur 1 - 3 zeigt die Signale für $G\alpha i2$ in den pEGFPC1-transfizierten Zellen und Spur 4 - 6 die Signale für $G\alpha i2$ in pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS-transfizierten INS-1 Mischzellklonen. Das in der Literatur angegebene Molekulargewicht für $G\alpha i2$ liegt bei 39 kD und damit nahe der 45 kD-Bande des Molekulargewichtsmarkers. In diesem Bereich sind auf dem Gel nur schwache bzw. keine spezifischen Signale sichtbar. Bei den schwachen Signalen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Kreuzreaktionen des Antikörpers mit den sehr viel stärker exprimierten Untereinheiten $G\alpha i3$ oder $G\alpha o$ handelt.

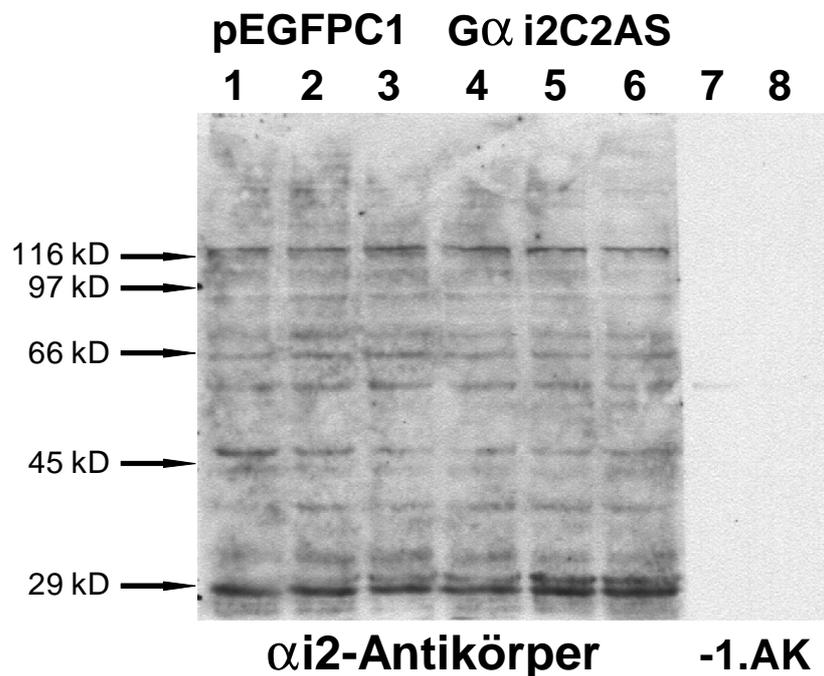


Abbildung 3.13.: Quantifizierung des $G\alpha i2$ -Proteingehaltes in pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Spur 1 - 3, 7: 20 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 transient transfizierter INS-1 Mischklone, Spur 4 - 6, 8: 20 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 $G\alpha i2$ C2AS transient transfizierter INS-1 Mischklone, Spur 1 - 6 wurden mit dem spezifisch gegen $G\alpha i2$ gerichteten Antikörper Spuren 7 und 8 wurden jeweils zur Kontrolle ohne den primären Antikörper inkubiert. Eine quantitative Veränderung der $G\alpha i2$ -Untereinheit konnte nicht beobachtet werden.

3.4.3. Quantifizierung der $G\alpha 3$ -Untereinheit in $G\alpha 3$ -Antisense transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Abbildung 3.14. zeigt den quantitativen Vergleich von pEGFPC1 $G\alpha 3$ C4AS transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen mit pEGFPC1 transfizierten INS-1 Kontrollmischzellen. Spur 1 - 3 zeigen pEGFPC1 transfizierte INS-1 Zellen, Spur 4 - 6 zeigen pEGFPC1 $G\alpha 2$ C2AS transfizierte INS-1 Mischzellklone. Spur 1 - 6 wurden mit dem spezifisch gegen $G\alpha 3$ gerichteten polyklonalen Antikörper inkubiert, Spur 7 und 8 (Spur 7: pEGFPC1 transfizierte INS-1 Zellen, Spur 8: pEGFPC1 $G\alpha 2$ C2AS transfizierte INS-1 Zellen) als Kontrolle nur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Spur 1 - 3 zeigt die Signale für $G\alpha 3$ in den pEGFPC1-transfizierten Zellen und Spur 4 - 6 die Signale für $G\alpha 3$ in pEGFPC1 $G\alpha 3$ C4AS-transfizierten INS-1 Mischzellklonen. Die Quantifizierung der analysierten Proben zeigte geringfügige Schwankungen innerhalb der jeweiligen Probe. Eine Reduktion des Proteingehaltes und damit eine Repression des $G\alpha 3$ war in Spur 4 - 6 jedoch nicht sichtbar. Da bei den durchgeführten Analysen des Proteingehaltes keine sichtbare Reduktion im Western zu verzeichnen war, erfolgte keine densitometrische Auswertung.

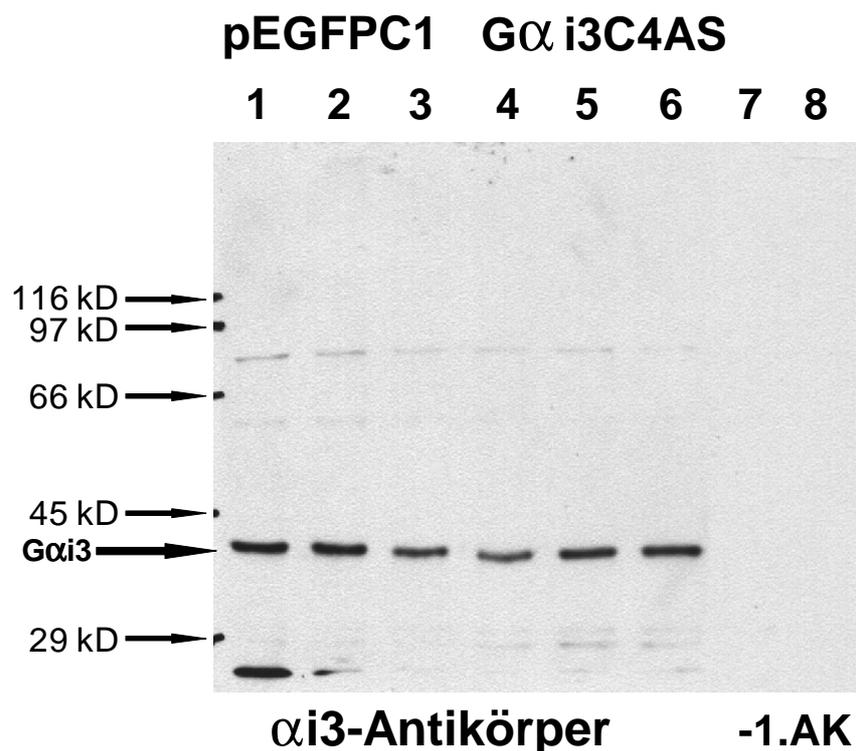


Abbildung 3.14.: Quantifizierung des $G\alpha 3$ -Proteingehaltes in pEGFPC1 $G\alpha 3$ C4AS transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Spur 1 - 3, 7: 5 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 transient transfizierter INS-1 Mischklone Spur 4 - 6, 8: 5 μ g einer partikulären Membranfraktion pEGFPC1 $G\alpha 3$ C4AS transient transfizierter INS-1 Mischklone, Spur 1 - 6 wurde mit dem spezifisch gegen $G\alpha 3$ gerichteten Antikörper, Spuren 7 und 8 wurden jeweils zur Kontrolle ohne den primären Antikörper inkubiert. Es konnte keine Veränderung des $G\alpha 3$ -Proteingehaltes nachgewiesen werden.

3.4.4. Insulinsekretion in Antisense-transfizierten INS-1 Mischzellklonen

Nach Analyse und Vergleich des Proteingehaltes der G α i1-, G α i2- und G α i3-Antisense-transfizierten INS-1 Mischzellklone auf proteinbiochemischer Ebene im Westernblot wurde untersucht, ob sich die Transfektion der INS-Zellen mit den G α i1-, G α i2- und G α i3-Antisense-Fragmenten auf die Insulinsekretion auswirkt. Dazu wurden pEGFPC1 transfizierte INS-1 Kontrollmischzellen mit den Antisense-transfizierten INS-1 Mischzellklonen verglichen (5. Anhang, 5.1. Fremdexperimente, 5.1.1. Insulinsekretionsstudien transient transfizierter INS-1 Zellen).

Zellen, die mit pEGFPC1 (Kontrollmischzellen), pEGFPC1G α i1AS-, pEGFPC1G α i2AS- und pEGFPC1G α i3AS-Konstrukten transfiziert worden waren, wurden zuerst basal mit 0.5 mmol/l Glukose stimuliert. Anschließend wurde durch die Gabe einer hohen Glukosekonzentration von 16.7 mmol/l und durch die zusätzliche Gabe von 5 μ mol/l Forskolin und 100 μ mol/l Tolbutamid die Insulinsekretion stimuliert: Forskolin aktiviert als Agonist direkt die Adenylatzyklase und damit über die Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA die Insulinsekretion. Tolbutamid, ein Agonist aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, bindet an den SUR-Rezeptor, einer Untereinheit des K⁺_{ATP}-abhängigen K-Kanals und schließt diesen. Die daraus resultierende Depolarisation stimuliert die Insulinsekretion.

Die Stimulation der Insulinsekretion wurde dann durch die Zugabe von 1 μ mol/l Adrenalin inhibiert: Durch die Bindung von Adrenalin an den α 2-adrenergen Rezeptor wird dieser aktiviert. Seine Interaktion mit einer inhibitorischen α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins senkt die Aktivität der Adenylatzyklase und durch die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration wird die Insulinsekretion inhibiert. Gleichzeitig werden durch die Einwirkung des β/γ -Komplexes der heterotrimeren G-Proteine K⁺-Kanäle geöffnet und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle geschlossen. Dadurch kommt es zur Repolarisierung der Zelle, die der Glukose- und Tolbutamid-induzierten Depolarisation und der damit verbundenen Insulinsekretion entgegenwirkt.

Die α -adrenerge Inhibition der Insulinsekretion in β -Zellen wird über PTX-sensitive, inhibitorische G-Proteine vermittelt. Bei Repression der G-Protein α -Untereinheiten wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Gabe des Adrenalins die G-Protein α -Untereinheit vermittelte Inhibition der Insulinsekretion aufgehoben worden wäre. Da die Insulinsekretion der pEGFPC1 transfizierten INS-1 Kontrollmischzellen sich bei Gabe von Adrenalin ebenso verhielt, wie die mit Antisense-transfizierten INS-1 Mischzellklonen, kann der Schluss gezogen werden, dass durch die Transfektion mit EGFP-Antisense-Fusions-DNA keine Repression der G-Protein α -Untereinheiten erzielt wurde.

3.5. Durchführung EGFP-negativer Antisense-Transfektionen

3.5.1. Ausschneiden des EGFP-Gens

Da bei Antisense-Transfektionen, bei denen EGFP als Reporter für die Expression der EGFP-Antisense-Fusions-mRNA diente, keine Antisense-induzierte Repression der G-Protein α -Untereinheiten im Westernblot zu verzeichnen war, wurde eine andere Antisense-Strategie gewählt, um die Effizienz der G α -Proteinrepression zu steigern: Das EGFP-Gen wurde zusammen mit der Kozak-Sequenz und dem Startkodon aus den Kontroll- und Antisense-Konstrukten herausgeschnitten. Die Expression der modifizierten Vektoren würde dann ausschließlich zur Expression der Antisense-DNA führen.

Das EGFP-Gen mit der MCS ist 811 bp lang, die Kozak-Konsensus-Sequenz liegt bei Position nt606 - nt616 bp, das Stopkodon bei nt1.417 kb, die letzte Aminosäure im Wildtyp EGFP entspricht nt1.327 - nt1.329 kb und die Region des human CMV-Promotors liegt bei nt1 – nt589 bp. Das EGFP-Gen wurde über die Schnittstellen Agel/BspEI aus den Vektoren und Konstrukten (Agel schneidet bei 601 bp, BspEI bei 1.331 kb) zusammen mit Kozak-Sequenz und Startkodon ausgeschnitten. Da es sich bei Agel und BspEI um Restriktionsenzyme handelt, die beim Schneiden kompatible Enden erzeugen, wurden die Konstrukte anschließend religiert und über verschiedene Restriktionsanalysen überprüft. Abbildung 3.15. zeigt die enzymatische Entfernung des EGFP-Gens über Agel/BspEI, die untere Bande im Gel entspricht dem ausgeschnittenen EGFP-Gen, welches ohne die MCS die Größe von 730 bp hat.

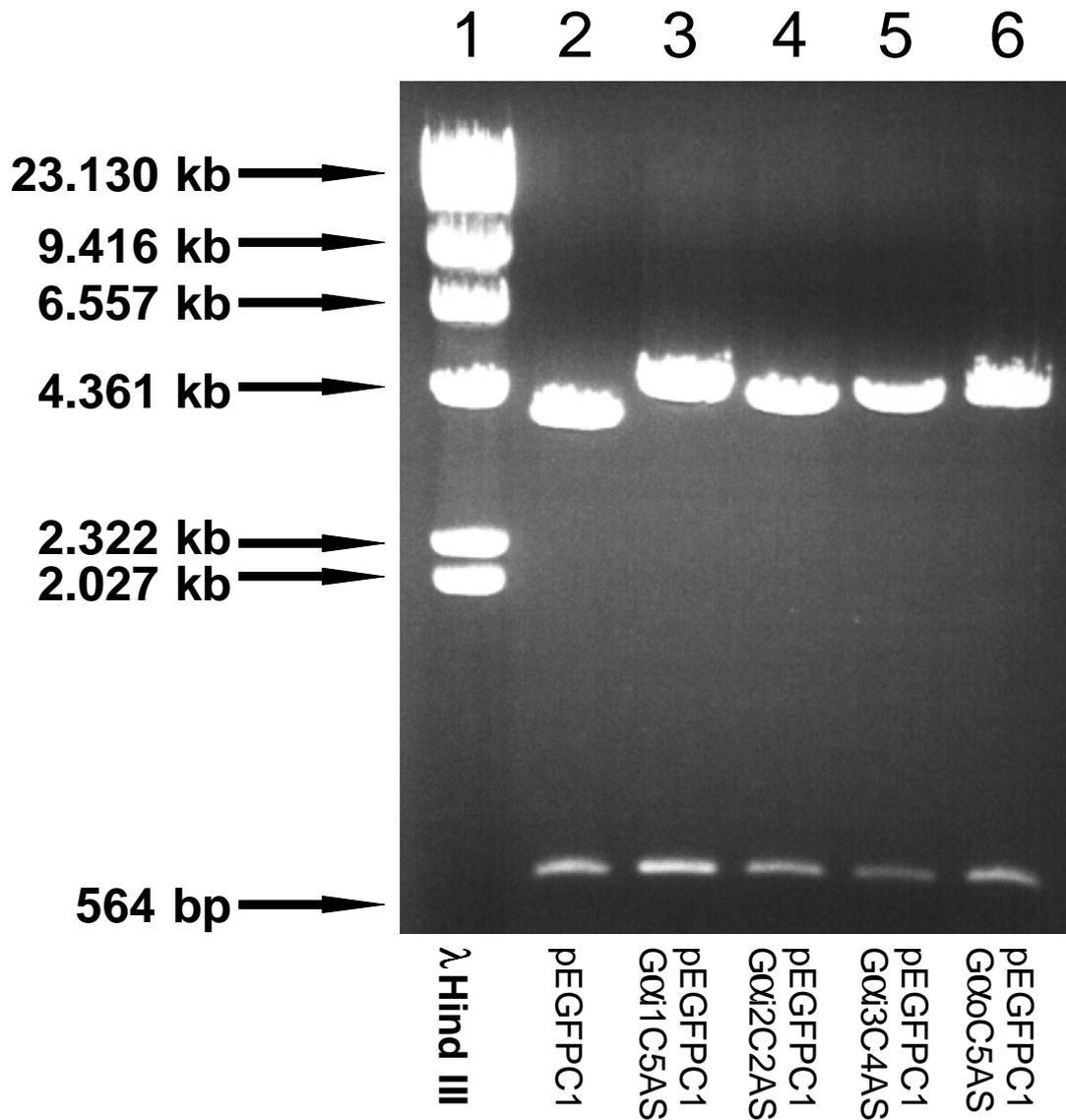


Abbildung 3.15.: Nachweis der Enzymatischen Entfernung des EGFP-Gens

Die Vektoren bzw. Antisense-Konstrukte (pEGFPC1, pEGFPC1Gαi1C5AS, pEGFPC1Gαi2C2AS, pEGFPC1Gαi3C4AS und pEGFPC1GαoC5AS) wurden mit Agel und BspEI geschnitten, wodurch das EGFP-Gen mit Startkodon entfernt wurde. Die Angaben in den Klammern entsprechen den durch die enzymatische Analyse erhaltenen Fragmenten. Der erste Zahlenwert entspricht der Länge des Restvektors in kb und der zweite Wert entspricht dem ausgeschnittenen EGFP-Gen in bp. Spur 1: λHindIII-Marker, Spur 2: pEGFPC1, (4.001 kb + 730 bp), Spur 3: pEGFPC1Gαi1C5AS (4.659 kb + 730 bp), Spur 4: pEGFPC1Gαi2C2AS (4.459 kb + 730 bp), Spur 5: pEGFPC1Gαi3C4AS (4.632 kb + 730 bp), Spur 6: pEGFPC1GαoC5AS (4.629 kb + 730 bp).

3.5.2. Kontrolle der EGFP defizienten Vektor-Konstrukte

Nachdem die das EGFP-Gen enthaltenden Vektoren mit Hilfe von Restriktionsenzymen modifiziert worden waren, wurde über eine Restriktionsanalyse mit *Asel/Vspl* und *Mlul* überprüft, ob das EGFP-Gen erfolgreich entfernt worden war. Die Konstrukte werden nach Herausschneiden des EGFP-Gens auch als pEGFPC1- (EGFP-negativ, EGFP-defizient) bezeichnet.

Asel schneidet an Position 8 im Vektor, *Mlul* schneidet an Position 1.642 kb. Nach Ausschneiden des EGFP-Gens ergaben sich bei der Restriktionsanalyse mit *Asel/Vspl* und *Mlul* für die verschiedenen EGFP-defizienten Antisense-Konstrukte die Fragmentlängen von 3.097 kb und 1.562 kb für pEGFPC1-G α i1C5AS, von 3.097 kb und 1.362 kb für pEGFPC1-G α i2C2AS, von 3.097 kb und 1.535 kb für pEGFPC1-G α i3AC4S, von 3.097 kb und 1.532 kb für pEGFPC1-G α oC5AS und von 3.097 kb und 904 bp für pEGFPC1- (Abbildung 3.16.). Wäre das EGFP-Gen noch in den Konstrukten vorhanden, so würden durch die enzymatische Analyse mit *Asel/Mlul* Fragmente entstehen, die um 730 bp größer wären.

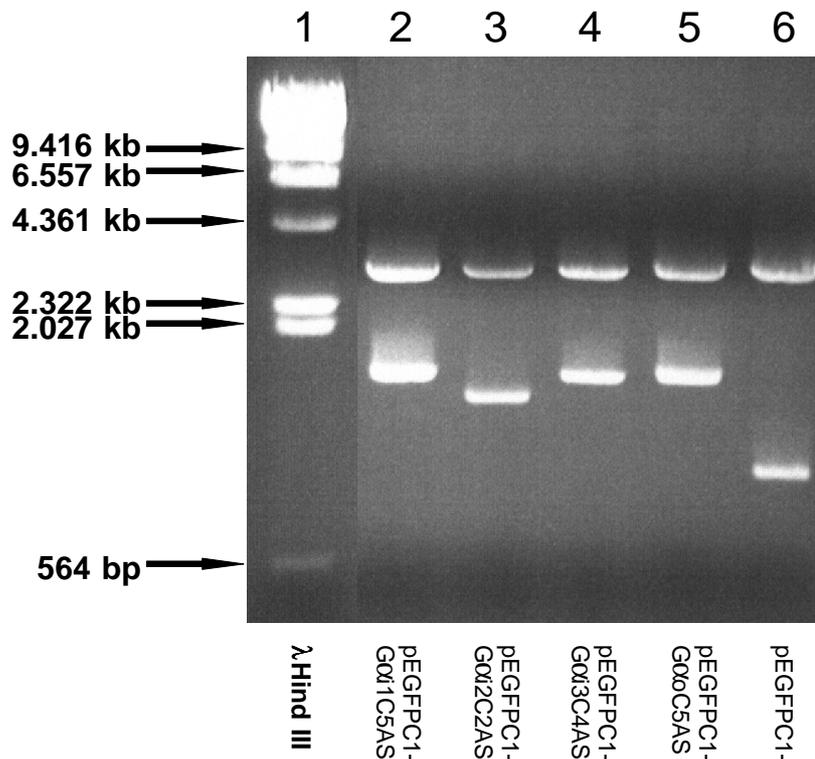


Abbildung 3.16.: Enzymatischer Nachweis der Entfernung des EGFP-Gens aus EGFP-negativen Vektor-Konstrukten

Die Konstrukte pEGFPC1-, pEGFPC1-G α i1C5AS, pEGFPC1-G α i2C2AS, pEGFPC1-G α i3C4AS und pEGFPC1-G α oC5AS wurden mit *Asel/Vspl* und *Mlul* geschnitten. Die Angaben in den Klammern entsprechen den durch die enzymatische Analyse erhaltenen Fragmenten. Der erste Zahlenwert entspricht der Länge des Restvektors in kb und der zweite Wert entspricht dem über *Asel/Mlul* ausgeschnittenen Fragmenten. Spur 1: λ HindIII-Marker, Spur 2: pEGFPC1-G α i1C5AS (3.097 kb + 1.562 kb), Spur 3: pEGFPC1-G α i2C2AS (3.097 kb + 1.362 kb), Spur 4: pEGFPC1-G α i3C4AS, (3.097 kb + 1.535 kb), (5) pEGFPC1-G α i1C5AS (3.097 kb + 1.532 kb), Spur 6: pEGFPC1- (3.097 kb + 904 bp).

Nachdem gezeigt worden war, dass das EGFP-Gen mit Kozak-Sequenz und Startkodon nicht mehr im Konstrukt enthalten war, wurde über eine EcoRI-Restriktionsanalyse nachgewiesen, dass die Antisense-Fragmente immer noch in den Konstrukten vorhanden waren.

Man erhielt für die EGFP-negativen Antisense-Konstrukte Fragmente in der Größe von 4.074 kb und 585 bp für pEGFPC1-G α i1C5AS, von 4.026 kb und 433 bp für pEGFPC1-G α i2C2AS, von 4.026 kb und 606 bp für pEGFPC1-G α i3C4AS und von 4.026 kb und 603 bp für pEGFPC1-G α oC5AS. Diese wurden auf einem Agarosegel (0.8%) aufgetrennt und sichtbar gemacht (Abbildung 3.17.).

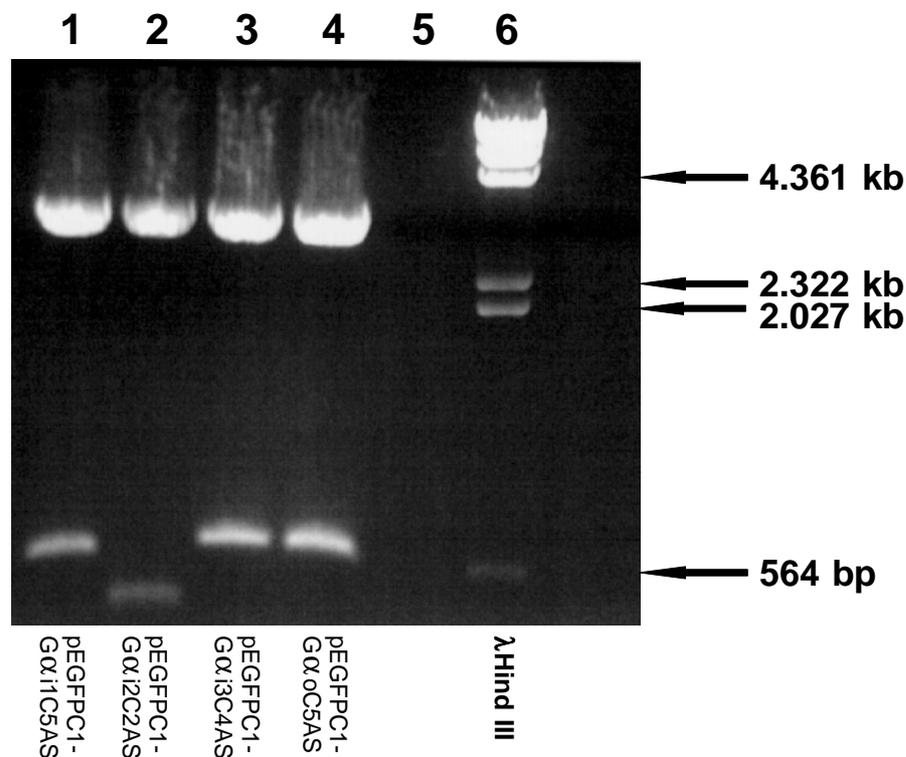


Abbildung 3.17.: Enzymatischer Nachweis der Inserts in den Konstrukten mit EcoRI

Die Angaben in den Klammern entsprechen den durch die enzymatische Analyse erhaltenen Fragmente. Der erste Zahlenwert entspricht der Länge des Restvektors in kb und der zweite Wert entspricht dem Antisense-Insert der jeweiligen G α -Untereinheit. Spur 1: pEGFPC1-G α i1C5AS (4.074 kb + 585 bp), Spur 2: pEGFPC1-G α i2C2AS (4.026 kb + 433 bp), Spur 3: pEGFPC1-G α i3C4AS (4.026 kb + 606 bp), Spur 4: pEGFPC1-G α oC5AS (4.026 kb + 603 bp), Spur 5: Blank, Spur 6: λ HindIII-Marker. Die enzymatische Restriktionsanalyse belegt das Vorhandensein der Antisense-Fragmente in den Vektoren.

3.5.3. Herstellung transient transfizierter INS-1 Mischzellklone mit EGFP-negativen Antisense-Konstrukten

Da die Signale für die $G\alpha i3$ -Untereinheit im Westernblot und im immunocytochemischen Nachweis am stärksten waren und am sichersten detektiert werden konnten, war bei dieser Untereinheit am ehesten mit einem signifikanten Antisense-Effekt zu rechnen. Daher wurden INS-1 Zellen transient mit dem EGFP-negativen $G\alpha i3$ -Antisense-Konstrukt transfiziert (pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$) und ausplattiert. Im Gegensatz zu den fluoreszierenden EGFP-positiven Antisense-Konstrukten, welche erst nach sechs Tagen über das Antibiotikum Geneticin (G418) selektioniert wurden, erfolgte bei den EGFP-negativen Konstrukten die Antibiotikabehandlung direkt am anderen Tag. Beim Medienwechsel 24 h nach der Transfektion wurde das Antibiotikum dem frischen Medium zugesetzt. Nach zwei Wochen selektiven Wachstums wurden die Zellen trypsinisiert und für die proteinbiochemische, quantitative Analyse weiter verarbeitet.

3.5.4. Quantifizierung pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transfizierter INS-1 Mischzellklone

Der Vergleich der Proteinmenge in den Spuren 4 - 6, in denen die partikuläre Membranfraktion pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transfizierter INS-1 Mischzellklone aufgetragen wurde, mit den Spuren 1 - 3, in denen Membranfraktionen untransfizierter INS-1 Kontrollzellen aufgetragen wurden, zeigt eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes für die Untereinheit $G\alpha i3$ (Abbildung 3.18.a). Die Referenzbande bei 60 kD hingegen, bei der es sich um ein unspezifisch gefärbtes Protein handelt, ist in allen 6 Spuren gleich stark vorhanden, was darauf hinweist, dass in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen wurde. Die Reduktion des Proteinsignals in den Spuren 4 - 6 ist damit ein eindeutiger Beweis für die Reduktion des $G\alpha i3$ -Proteingehaltes und damit für die Antisense-induzierte Repression der $G\alpha i3$ -Untereinheit in mit dem Antisense-Konstrukt (pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$) transfizierten INS-1 Mischzellen. Die Signale für $G\alpha i3$ wurden im Nachfolgenden quantifiziert und in Relation zum Kontrollsignal bei 60 kD gesetzt.

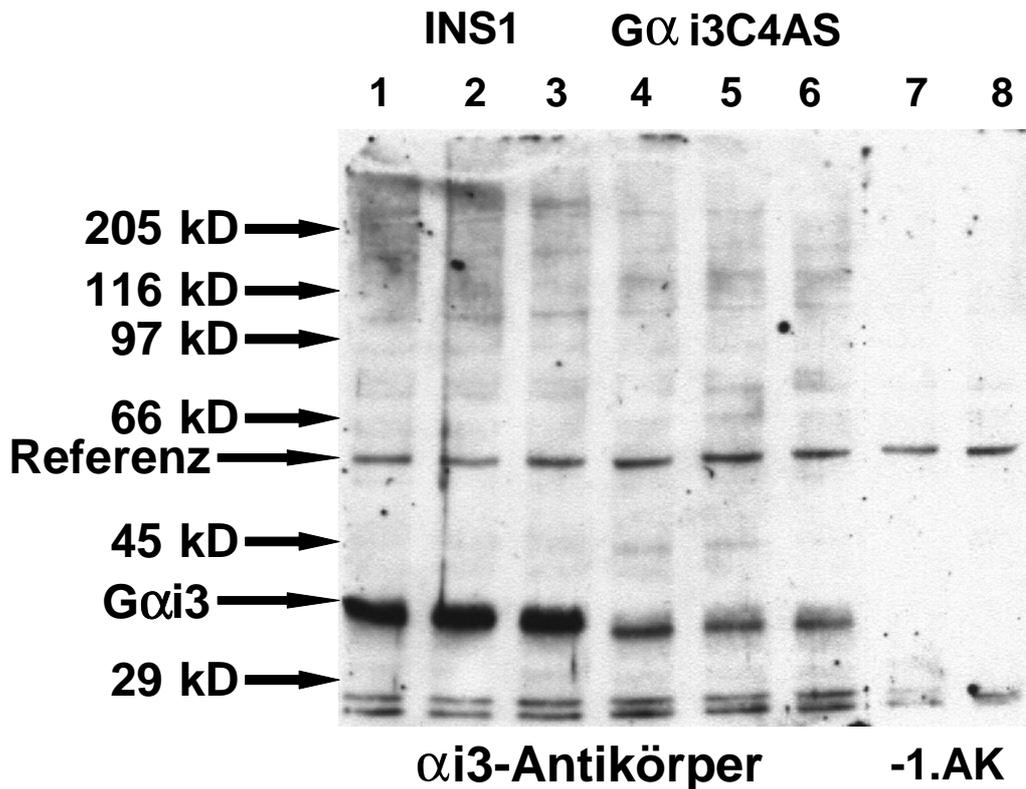


Abbildung 3.18.: Quantifizierung von pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Mischzellklonen

Abbildung 3.18.a: Westernblot transient transfizierter pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Mischzellklone

Spur 1 - 3, 7: Partikuläre Membranfraktion von INS-1 Zellen, Spur 4 - 6, 8: partikuläre Membranfraktion von pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Mischzellklonen, Spur 1 - 6 wurde mit dem gegen die G α i3 Untereinheit gerichteten Primärantikörper, Spur 7 und 8 wurden nur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Vergleich der als G α i3-Untereinheit identifizierten Proteinbande zwischen den untransfizierten INS-1 Zellen in den Spuren 1 - 3 mit den pEGFPC1-G α i3C4AS transfizierten Zellen zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinmenge für die G α i3 Untereinheit in den Spuren 4 - 6. Eine als Referenz dienende unspezifisch angefärbte Proteinbande bei 60 kD zeigt einen gleichmäßigen Auftrag an Proteinlösung in allen sechs Spuren. Die G α i3-Untereinheit war in den transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen deutlich repräsentiert.

Die Quantifizierung⁷ der durch das pEGFPC1-G α i3C4AS-Konstrukt induzierten Antisense-Repression der G α i3-Untereinheit wurde durchgeführt, indem die auf den ECL-Folien abgebildeten Proteinbanden in ein Rechteck eingefasst werden. Nach Integration der Fläche des Rechtecks erhält man einen dimensionslosen Wert AID für die „Absolut Integrierte Dichte“ der Fläche dieses Rechtecks. Wird von diesem Wert AID der Hintergrund als Mittelwert subtrahiert, so erhält man den Wert für die DID „Differenzierte Integrierte Dichte“. Dieser weicht dann um den Hintergrundwert vom AID-Wert ab. Da bei der Quantifizierung

⁷ Die ECL-Folien der Acrylamidgels wurde eingescannt und mit Hilfe des Programms Lab Office 2000 (Gelscan 3D, Professional V.3.1, BioSciTec) nach Abspeicherung als Bild im TIFF-Format (Tagged Image File Format) quantifiziert. Alle weiteren Quantifizierungen wurden nach dem gleichen Verfahren durchgeführt.

der Gele eine Subtrahierung des Hintergrundes nicht notwendig war, wurde der AID-Wert für die Quantifizierungen verwendet.

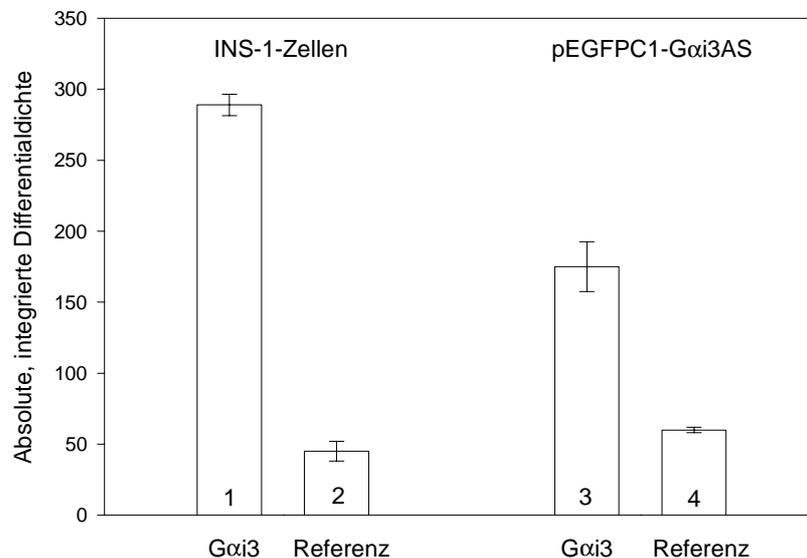


Abbildung 3.18.b: Quantifizierung der AS-Proteinreduktion

Säule 1 zeigt den Mittelwert für die AID (absolute integrierte Dichte) der für die in INS-1 Zellen als Gαi3 identifizierte Bande. Der Mittelwert liegt bei 289 ± 7.55 ($n = 3$). Säule 3 zeigt den Mittelwert für die AID für Gαi3 in pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten INS-1 Zellen, der 175 ± 17.6 ($n = 3$) beträgt. Es ist eine deutliche Differenz des Mittelwertes der absoluten AID im Vergleich zu der untransfizierten INS-1 Kontrolle zu verzeichnen. Dies korreliert mit der deutlich reduzierten Menge an Gαi3 Protein in den pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten Zellen in den Spuren 4 - 6 (Abbildung 3.18.a). Die Differenz der beiden Mittelwerte für Gαi3 liegt bei 114. Die Referenzsäulen 2 und 4 entsprechen der Bande bei 60 kD in den Spuren 1 - 6; deren Mittelwert der absoluten DID soll als Maß für die gleiche Menge an aufgetragenem Protein in allen 6 Spuren dienen. Er beträgt für die untransfizierten INS-1 Zellen 45 ± 7 ($n = 3$) und für die pEGFPC1-Gαi3C4AS 60 ± 2 ($n = 3$).

Die Quantifizierung der für Gαi3 erhaltenen Signale zeigt eine Reduktion des Gαi3-Proteingehaltes in pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten INS-1 Mischzellklonen bei einem Mittelwert der AID von 289 ± 7.55 ($n = 3$), für untransfizierte INS-1 Zellen auf einen Mittelwert der AID von 175 ± 17.6 ($n = 3$), für pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierte INS-1 Mischzellklone (Abbildung 3.18.b). Die Differenz der beiden Mittelwerte liegt bei 114 und ist das Maß für die Reduktion bzw. die Repression des Gαi3-Gehaltes in pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten Zellen. Der Wert der Signifikanz liegt bei $p < 0.001$; daher kann von einer signifikanten Proteinrepression der Gαi3-Untereinheit gesprochen werden.

Der Mittelwert der Referenz lag für die untransfizierten INS-1 Zellen bei einer AID von 45 ± 7 ($n = 3$) und für die pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten Zellen bei einer AID von 60 ± 2 ($n = 3$). Damit wird deutlich, dass es sich um eine tatsächliche Antisense-Repression und nicht um einen unterschiedlichen Auftrag an Proteinlösung handelt.

Die AID-Werte für $G\alpha i3$ wurden in Relation zu den Werten der unspezifisch gefärbten Kontrollbande bei 60 kD gesetzt und auf prozentuale Werte normiert. Der Wert für untransfizierte INS-1 Zellen entspricht mit 6.4 100% (289 : 45) und der Wert für pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transfizierte INS-1 Zellen liegt mit 2.9 bei 45.3% (175 : 60). Dies entspricht einer tatsächlichen Proteinreduktion der $G\alpha i3$ -Untereinheit in pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transfizierten INS-1 Zellen von 54.7% (Abbildung 3.18.c).

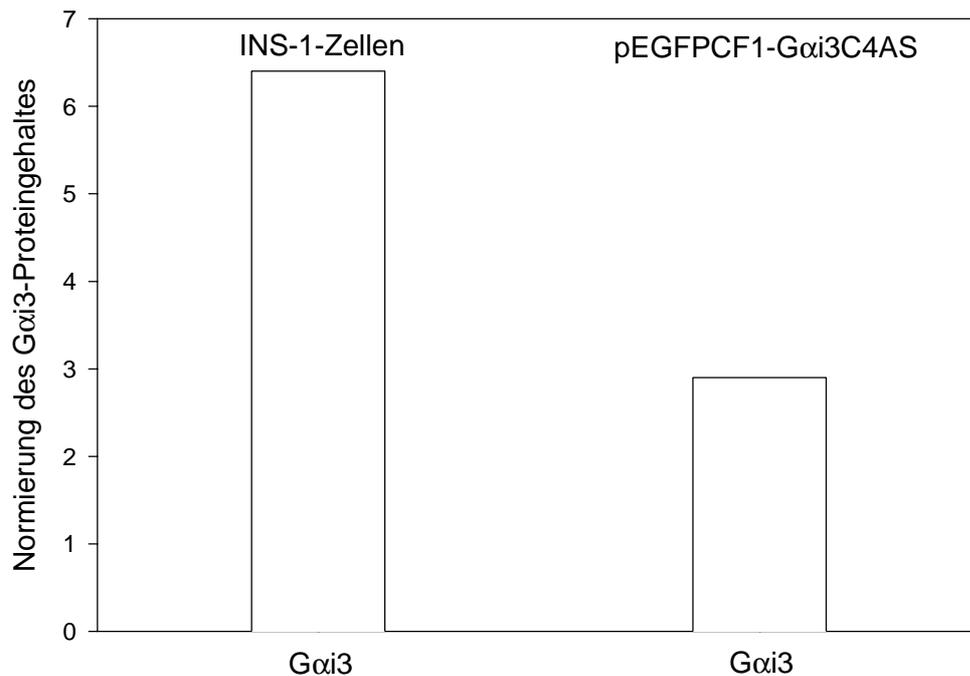


Abbildung 3.18.c: Normierung der $G\alpha i3$ -Repression

Die Werte für die reprimierte $G\alpha i3$ -Untereinheit werden in Relation gesetzt zu dem für das Kontrollsignal erhaltenen AID-Wert. Die AID-Werte für $G\alpha i3$ werden ins Verhältnis zu den Werten für das Kontrollsignal bei 60 kD gesetzt: Für die untransfizierten INS-1 Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis 289:45 der Wert 6.4, für die transient transfizierten $G\alpha i3$ -INS-1 Mischzellklone ergibt sich aus dem Verhältnis von 175:60 der Wert 2.9. Durch die Normierung wird die Schwankung des Proteinauftrages relativiert. In den $G\alpha i3$ transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen ist der $G\alpha i3$ -Gehalt verglichen zur untransfizierten INS-1 Kontrolle um 54.5% reduziert.

3.6. Etablierung stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone

3.6.1. Durchführung der Transfektion und Etablierung stabil transfizierter Einzelzellklone

Nach erfolgreicher Reduktion des Proteingehaltes der $G\alpha i3$ Untereinheit in mit pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen, wurden stabil transfizierte INS-1 Einzelzellklone mit den Konstrukten pEGFPC1- (EGFP defiziente Negativkontrolle), pEGFPC1- $G\alpha i1C5AS$, pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ und pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ hergestellt. Zu diesem Zweck wurden INS-1 Zellen mit den entsprechenden Vektor-Konstrukten über Elektroporation transfiziert, ausplattiert und direkt am anderen Tag beim Medienwechsel mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) selektioniert. Nach vierwöchiger G418-Selektion hatten sich Kolonien einzelner Zellklone gebildet, die dann gepickt und in 96 MWs transferiert wurden. Von jedem Antisense-Konstrukt wurden jeweils 24 stabil transfizierte, G418 resistente, Einzelzellklone (für pEGFPC1-, für pEGFPC1- $G\alpha i1C5AS$, für pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ und für pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$) selektiert und weiter prozessiert. Während des Wachstums der Klone erfolgte die Umsetzung von 96 MWs, auf 48 Mws und zuletzt auf 24 MWs. Nach insgesamt sechsmonatiger Aufzucht wurden die Zellen in großen Greiner-Gewebekulturflaschen für die weiteren Analysen auf proteinbiochemischer Ebene und für Insulinsekretionsstudien weiter verarbeitet. Zu diesem Zeitpunkt handelt es sich um stabil transfizierte INS-1 Einzelzellklone.

3.6.2. Durchmusterung der $G\alpha i3$ -Proteinrepression in stabilen INS-1 Einzelzellklonen

Nach Etablierung stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone wurden diese nach Aufbereitung als partikuläre Membranfraktionen im Westernblot auf eine nachweisbare $G\alpha i3$ -Proteinrepression hin untersucht und anschließend quantifiziert (Abbildung 3.19.). Das Proteinmuster der beiden Einzelzellklone zeigt eine deutliche Reduktion des $G\alpha i3$ -Proteingehaltes in den beiden stabilen INS-1 Zellklonen pEGFPC1- $G\alpha i3C4ASC1$ und pEGFPC1- $G\alpha i3C4ASC7$ im Vergleich zum mit pEGFPC1- (EGFP negativ) transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17. $G\alpha i3$ ist in Klon C7 stärker reprimiert als in Klon C1.

Nach quantitativer Auswertung des Einzelexperiments⁸ ergab sich für den Klon C1 (AID = 84.3) eine Reduktion des $G\alpha i3$ -Gehaltes um 58% auf einen Proteingehalt von 42% und für den Klon C7 (AID = 25.4) eine Reduktion um 87% auf 13% (Abbildung 3.19.b), bezogen auf den $G\alpha i3$ -Proteingehalt des INS-1 Kontrollklons C17 (AID = 200.7). Diese Befunde wurden durch Wiederholung der Experimente mit neuen Proteinproben partikulärer Membranfraktionen bestätigt.

⁸ Dieses Experiment wurde während der Analyse der 24 Einzelklone, die mit pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ stabil transfiziert worden waren, erzielt. Deshalb sind hier für jeden stabilen Zellklon nur Einzelwerte vorhanden. Die erzielte Repression soll anschließend in Experimenten, in denen neue Proteinproben partikulärer Membranfraktionen analysiert werden, erneut überprüft werden.

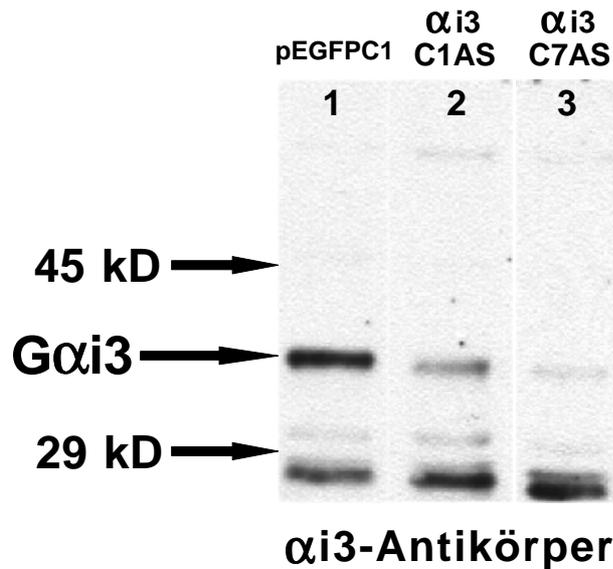


Abbildung 3.19: Quantifizierung der $G\alpha i3$ -Repression von pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ transfizierten INS-1 Einzelzellklonen

Abbildung 3.19.a: Vergleich des Gehaltes der $G\alpha i3$ -Untereinheit in stabilen INS-1 Einzelzellklonen
 Spur 1: pEGFPC1-C17 (EGFP negativer INS-1 Kontrollklon), Spur 2: stabil transfizierter pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ INS-1 Einzelzellklon C1, Spur 3: stabil transfizierter pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ INS-1 Einzelzellklon C7. Die mit pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ stabil transfizierten Einzelzellklone weisen eine starke Reduktion des Proteingehaltes der als $G\alpha i3$ identifizierten Bande im Vergleich zum pEGFPC1-transfizierten Kontrollklon C17 auf.

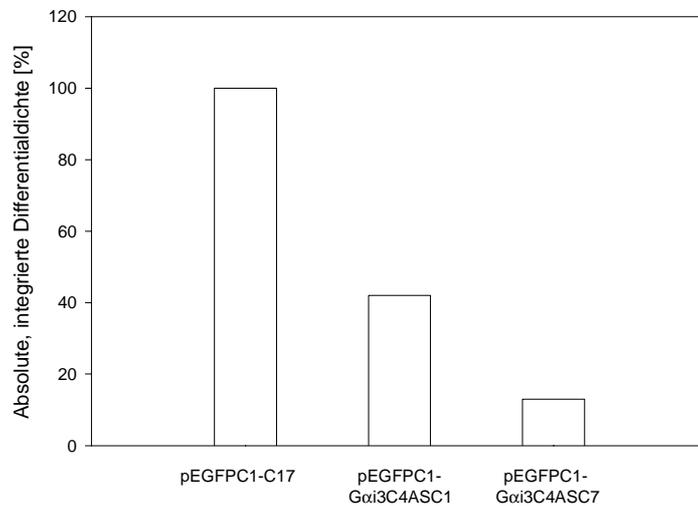


Abbildung 3.19.b: Prozentuale Evaluation der AS-Proteinreduktion

Säule 1: pEGFPC1-transfizierter, stabiler INS-1 Einzelzellklon C17 (Kontrolle), Säule 2: pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklon C1, Säule 3: pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklon C7. Der Vergleich der beiden stabil transfizierten Einzelzellklone pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C1 und C7 mit dem pEGFPC1-transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17 zeigte eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes in den Spuren 2 und 3. Der Wert für die AID betrug für den Kontrollklon C17 200.7, für Klon C1 84.3 und für Klon C7 25.4. Die Reduktion des Proteingehaltes für die $G\alpha i3$ -Untereinheit betrug beim Klon C1 58% und beim Klon C7 87%.

3.6.3. Quantifizierung der G α i3-Proteinrepression im stabilen INS-1 Einzelzellklon C1

Nachdem eine starke Proteinrepression der G α i3-Untereinheit bei zwei der 24 G418-selektierten Klone nachgewiesen werden konnte, sollte dieser Befund mit neuen Proteinproben partikulärer Membranfraktionen wiederholt und so bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde von einer späteren Zellpassage des pEGFPC1-C17 INS-1 Kontrollklons C17 sowie vom pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Klon C1 und dem pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Klon C7 erneut eine partikuläre Membranfraktion auf die erfolgreiche Repression hin analysiert. In Abbildung 3.20.a ist die Repression der G α i3-Untereinheit im Einzelzellklon C1 im Westernblot deutlich erkennbar.

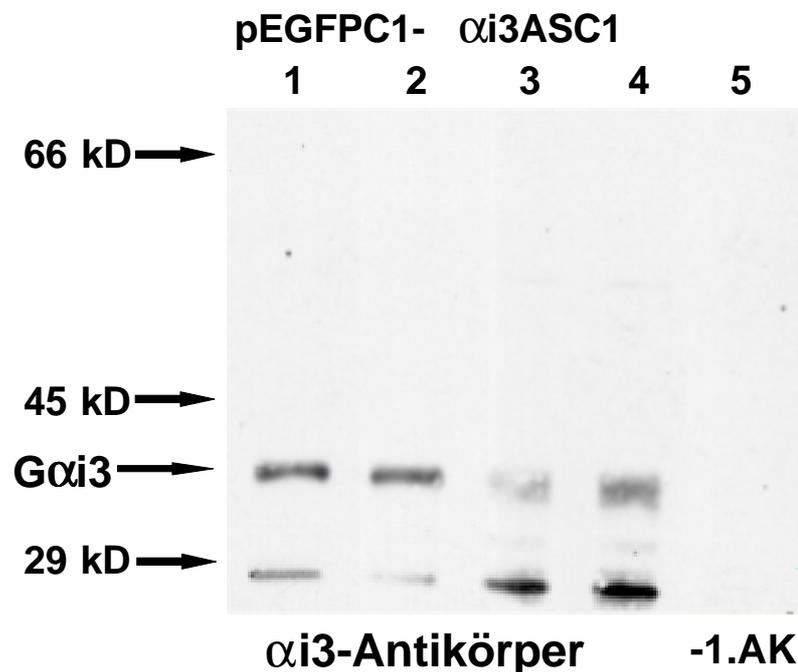


Abbildung 3.20.: Quantifizierung der G α i3-Proteinrepression im pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Einzelzellklon C1

Abbildung 3.20.a: Analyse der G α i3-Repression des pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Einzelzellklons C1

Der stabil transfizierte, G418 resistente, pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Einzelzellklon C1 wurde mit dem pEGFPC1- transfizierten INS-1 Kontrollklon C17 verglichen. Spur 1, 2, 5: pEGFPC1- stabil transfizierter INS-1 Einzelzellkontrollklon C17, Spur 3, 4: pEGFPC1-G α i3C4AS stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklon C1. Spur 1 - 4 wurde mit dem spezifischen gegen G α i3 gerichteten Antikörper inkubiert, Spur 5 wurde zur Kontrolle der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers ohne Primärantikörper inkubiert. Der Proteingehalt der als G α i3 identifizierten Bande ist in den Spuren 3 und 4 (pEGFPC1-G α i3C4AS stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklon C1) verglichen mit dem Proteingehalt in Spur 1 und 2 (pEGFPC1-transfizierter Kontrollklon C17) deutlich reduziert.

Die Quantifizierung der Signale für G α i3 (Abbildung 3.20.b, 3.20.c) zeigt erneut eine Reduktion des G α i3-Proteingehaltes im pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Klon C1. Der ermittelte AID-Wert für G α i3 liegt in den Kontrollzellen (pEGFPC1- transfizierter INS-1

Einzelzellklon C17) bei 147 ± 7.1 ($n = 2$) und für den Antisense-transfizierten Klon C1 (pEGFPC1-G α i3C4AS transfizierter INS-1 Einzelzellklon C1) bei 135 ± 35.9 ($n = 2$).

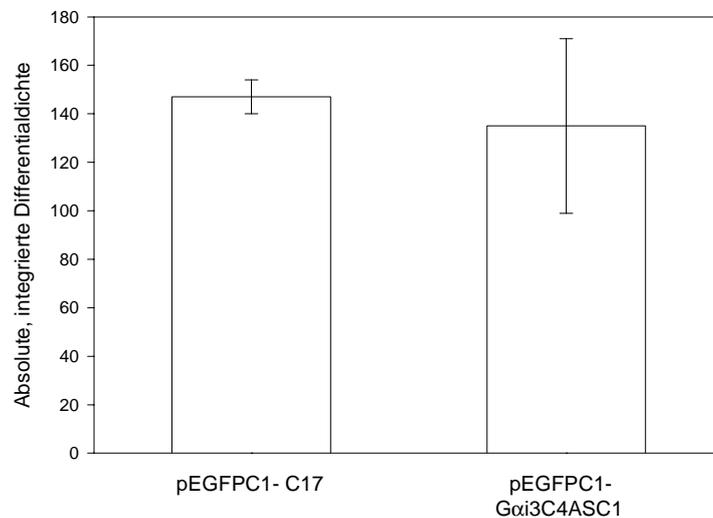


Abbildung 3.20.b: Quantitative Evaluation der AS-Proteinreduktion

Säule 1 zeigt den Mittelwert der AID für die als G α i3 identifizierte Bande im pEGFPC1- stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17. Dieser liegt bei 147 ± 7.1 ($n = 2$) und wird auf 100% normiert. Säule 2 zeigt den Mittelwert der AID für G α i3 im pEGFPC1-G α i3C4AS stabil transfizierten INS - 1 Einzelzellklon C1. Dieser liegt bei 135 ± 35.9 ($n = 2$) und entspricht 92%. Der Wert des Proteingehaltes im pEGFPC1-G α i3C4AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C1 weicht damit um 8% von dem Proteingehalt des pEGFPC1-C17 transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17 ab. Dies korreliert mit der Reduktion des G α i3-Proteingehaltes im pEGFPC1-G α i3C4AS-INS-1 Einzelzellklon C1 in den Spuren 3 und 4.

Beim Antisense-Klon pEGFPC1-G α i3C4AS INS-1 Einzelzellklon C1 beträgt der AID-Wert für G α i3 135 ± 35.9 und entspricht damit 92% verglichen mit dem pEGFPC1- transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17 dessen AID-Wert bei 147 ± 7.1 liegt und als Kontrolle 100% entspricht. Die Proteinreduktion lag hier mit 8% unter dem Wert, der während der Durchmusterung der 24 Einzelzellklone erzielt wurde.

3.6.4. Quantifizierung der $G\alpha 3$ -Proteinrepression im stabilen INS-1 Einzelzellklon C7

Die erneute Analyse des pEGFPC1- $G\alpha 3$ C4AS INS-1 Einzelzellklons C7 zeigt eine deutliche Reduktion des $G\alpha 3$ -Proteingehaltes im Westernblot verglichen mit dem pEGFPC1- INS-1 Kontrollklon C17 (Abbildung 3.21). Die Signale für $G\alpha 3$ in den Spuren 3 und 4 sind nur schwach vorhanden. Die quantitative Analyse ergibt für $G\alpha 3$ einen AID-Wert von 118 ± 25.5 ($n = 2$) in den pEGFPC1- transfizierten Kontrollzellen (Einzelzellklon C17) und einen AID-Wert von 33 ± 1.4 ($n = 2$) im Antisense transfizierten INS-1 Einzelzellklon C7 (pEGFPC1- $G\alpha 3$ C4AS Einzelzellklon C7). Die Normierung der AID-Werte zeigt eine Reduktion des $G\alpha 3$ -Gehaltes in Antisense transfizierten INS-1 Einzelzellklonen verglichen mit der Kontrolle um 71.2% auf 28.8%.

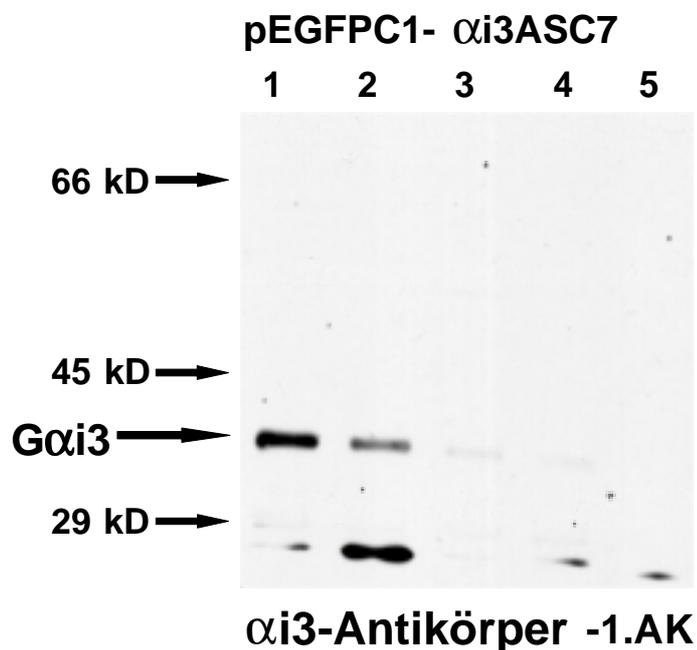


Abbildung 3.21.: Quantifizierung des pEGFPC1- $G\alpha 3$ C4AS Einzelzellklons C7

Abbildung 3.21.a: Detektion der Antisense-induzierten Proteinreduktion der $G\alpha 3$ Untereinheit

Spur 1, 2, 5: pEGFPC1-C17 stabil transfizierter INS1 Einzelzellkontrollklon C17, Spur 3, 4: pEGFPC1- $G\alpha 3$ C4AS stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklon C7. Spur 1 - 4 wurden mit dem spezifischen gegen $G\alpha 3$ gerichteten Antikörper inkubiert, Spur 5 wurde zur Kontrolle der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers ohne den Primärantikörper inkubiert. Die $G\alpha 3$ identifizierten Banden zeigen eine deutliche Reduktion der Proteinmenge in den Spuren 3 und 4 verglichen mit den pEGFPC1-transfizierten Kontrollen in Spur 1 und 2.

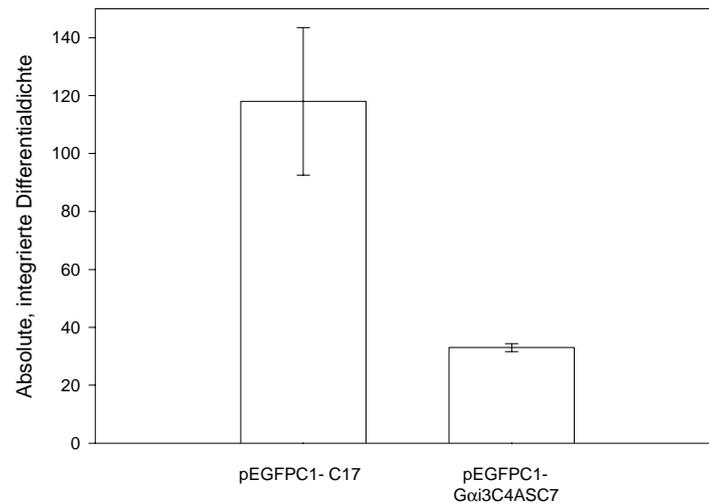


Abbildung 21b: Quantitative Evaluation der Antisense-Proteinreduktion

Säule 1 zeigt den Mittelwert der AID für den Proteingehalt der Gαi3-Untereinheit im pEGFPC1- stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17. Er liegt bei 118 ± 25.5 ($n = 2$). Säule 2 zeigt den Mittelwert der AID für die Gαi3-Untereinheit im pEGFPC1-Gαi3C4AS stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklon C7. Er beträgt 33 ± 1.4 ($n = 2$). Es zeigt sich eine deutliche Differenz der AID-Mittelwerte im Vergleich zu den pEGFPC1- stabil transfizierten INS-1 Kontrollklon C17 und dem pEGFPC1-Gαi3C4AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C7. Wird der Mittelwert der AID des pEGFPC1-C17 Kontrollklons C17 normiert auf 100%, so entspricht der AID-Mittelwert für Gαi3C4AS-INS-1 Einzelzellklon C7 28,8%. Die Reduktion des Gai3-Gehaltes beträgt 71.2%. Die hohe Standardabweichung für den Kontrollklon C17 erklärt sich aus der Schwankung beim Proteinauftrag. Trotz dieser hohen Standardabweichung ist die Reduktion des Proteingehaltes im pEGFPC1- Gαi3C4AS INS-1 Einzelzellklon C7 deutlich.

Nach der Quantifizierung der stabilen Klone Gαi3C4AS-INS-1 Klon C1 und Gαi3C4AS-INS-1 Klon 7 wurde Klon 7 mit der stärkeren Repression für weitere Experimente ausgewählt.

3.6.5. Insulinsekretion in $G\alpha i3$ -Antisense-transfizierten INS-1 Einzelzellklonen

Nach Quantifizierung der $Gai3$ -Repression in den beiden Einzelzellklonen pEGFPC1- $G\alpha i3C4$ INS-1 Einzelzellklon C1 und C7 wurde der Effekt der Repression auf die Insulinsekretion analysiert (5. Anhang, 5.1. Fremdexperimente, 5.1.2.: Insulinsekretionsstudien stabil transfizierter INS-1 Zellen). Die Insulinsekretion im pEGFPC1- Kontrollzellklon C17 wurde mit der Insulinsekretion in den Einzelzellklonen pEGFPC1- $G\alpha i3C4$ INS-1 Einzelzellklon C1 und pEGFPC1- $G\alpha i3C4$ INS-1 Einzelzellklon C7 verglichen.

Nach einer basalen Stimulation der Einzelzellklone mit 0.5 mmol/l Glukose wurde durch die Gabe einer hohen Glukosekonzentration von 16.7mmol/l und durch die zusätzliche Gabe von 5 μ mol/l Forskolin die Insulinsekretion stimuliert: Der Agonist Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase, wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht wird. Über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) wird so die Insulinsekretion angeregt. Anschließend wird die Stimulation der Insulinsekretion durch die Zugabe von 1 μ mol/l Adrenalin inhibiert: Adrenalin bindet an den α -adrenergen Rezeptor und aktiviert diesen. Durch die Interaktion des α -adrenergen Rezeptors mit der inhibitorischen α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins wird die Aktivität der Adenylatzyklase gesenkt, und durch die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration wird die Insulinsekretion inhibiert.

Die α -adrenerge Inhibition der Insulinsekretion in β -Zellen wird über PTX-sensitive, inhibitorische G-Proteine vermittelt.

Stimmt die Annahme, dass $G\alpha i3$ die Adenylatzyklase und damit verbunden die Insulinsekretion über die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration inhibiert, so wäre bei erfolgreicher Repression der G-Protein α -Untereinheiten zu erwarten gewesen, dass durch die Gabe des Adrenalins die G-Protein α -Untereinheit vermittelte Inhibition der Insulinsekretion aufgehoben worden wäre.

Die Insulinsekretion im pEGFPC1- Kontrollzellklon C17 zeigt dasselbe Verhalten wie die Insulinsekretion in den beiden Einzelzellklonen pEGFPC1- $G\alpha i3C4$ INS-1 Einzelzellklon C1 und C7. Durch die Gabe der 0.5 mmol/l Glukose wird eine basale Stimulation der Insulinsekretion erreicht, die Gabe von 16.7 mmol/l Glukose und 5 μ mol/l Forskolin führt zu einer starken Stimulation der Insulinsekretion. Unter der Stimulation durch Glukose und Forskolin entspricht die Menge an freigesetztem Insulin ungefähr der sechsfachen Menge des unter basaler Stimulation freigesetzten Insulins. Bei der Applikation von 1 μ mol/l Adrenalin wird in den Kontrollzellen wie in den Antisense-transfizierten Zellen die Insulinsekretion gehemmt.

In den zwei voneinander unabhängig erhaltenen stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklonen pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C1 und C7 konnte trotz der Repression der $G\alpha i3$ -Untereinheit keine Veränderung der Adrenalin-Sensitivität der Glukose-stimulierten Insulinsekretion gemessen werden.

3.6.6. Weitere Analysen

3.6.6.1. Analyse der Spezifität der $G\alpha i3$ -Repression in pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ -INS-1 Klon

C7 und Analyse der $G\alpha o$ -Repression in pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ INS-1 Klon C17

Anhand der Expression der strukturell verwandten $G\alpha o$ -Untereinheit soll untersucht werden, ob der Antisense-Effekt des stabil expremierten $G\alpha i3$ -Antisense-Fragments spezifisch ist oder ob es zu einer gleichzeitigen, unerwünschten Repression des $G\alpha o$ kommt.

Außerdem soll analysiert werden, ob es durch die Repression der $G\alpha i3$ -Untereinheit in dem pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ -INS-1 Einzelzellklon C7 möglicherweise zu einer kompensatorischen Überexpression der $G\alpha o$ -Untereinheit kommt. Zusätzlich wird ein INS-1 Klon (pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ INS-1 Klon C17), dessen $G\alpha o$ -Untereinheit reprimiert wurde, quantifiziert. Der Einzelzellklon pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ INS-1 Klon C7 wird mit einem spezifisch gegen $G\alpha o$ -Untereinheiten gerichteten Antikörper analysiert. Die Analyse der Proteinproben zeigt eine geringe Reduktion des G-Proteingehaltes von $G\alpha o$ im stabil transfizierten pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ INS-1 Klon C17 und keine sichtbare Reduktion des $G\alpha o$ im bereits analysierten pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ INS-1 Klon C7.

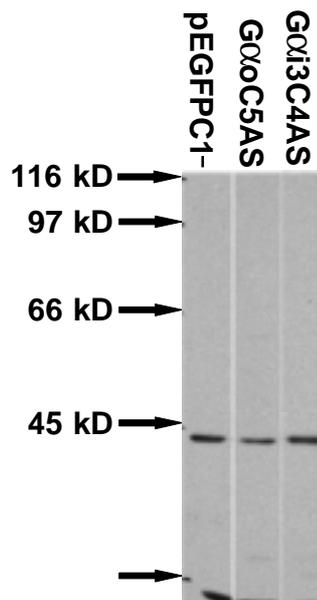


Abbildung 3.22.: Quantifizierung des $G\alpha o$ -Gehaltes in transfizierten INS-1 Einzelzellklonen

Abbildung 3.22.a: Detektion der Antisense-induzierten Proteinreduktion der $G\alpha o$ -Untereinheit

Spur 1: pEGFPC1-INS-1 Einzelzellklon C17, Spur 2: pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ Einzelzellklon C17, Spur 3: pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C7. Die Spuren wurden mit dem gegen die $G\alpha o$ -Untereinheit gerichteten Antikörper inkubiert. Der Einzelzellklon pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ C17 zeigt nur eine schwache Reduktion des $G\alpha o$ -Proteingehaltes. Die Proteinmenge der $G\alpha o$ -Untereinheit scheint auch bei dem pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C7 nicht oder nur schwach reduziert zu sein. Dies spricht für eine spezifische Antisense-induzierte Proteinrepression der $G\alpha i3$ -Untereinheit im stabilen pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C7. Ein weiterer Befund ist, dass es zu keiner verstärkten Expression der $G\alpha o$ -Untereinheit im pEGFPC1- $G\alpha i3C4AS$ Einzelzellklon C7 kommt, d.h. dass die Reduktion des Proteingehaltes der $G\alpha i3$ -Untereinheit zu keiner Kompensation durch eine verstärkte Expression der $G\alpha o$ -Untereinheit führt.

Die Quantifizierung der Proteinsignale für $G\alpha$ ergibt einen AID-Wert von 114 für den pEGFPC1- transfizierten INS-1 Einzelzellkontrollklon C17. Der Wert für den pEGFPC1- $G\alpha$ C5AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17 liegt bei 89 und ist um 22% auf einen $G\alpha$ -Proteingehalt von 78% reduziert. Die Reduktion der $G\alpha$ -Untereinheit ist bei dem pEGFPC1- $G\alpha$ C5AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C17 mit 22% eher schwach.

Die Überprüfung des $G\alpha$ -Gehaltes im pEGFPC1- $G\alpha$ i3C4AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C7 ergibt einen AID-Wert von 108 und ist um 5% geringfügig auf 95% reduziert. Eine kompensatorische Überexpression der $G\alpha$ -Untereinheit konnte im pEGFPC1- $G\alpha$ i3C4AS transfizierten INS-1 Einzelzellklon C7 ebensowenig nachgewiesen werden wie eine unspezifische Repression der $G\alpha$ -Untereinheit.

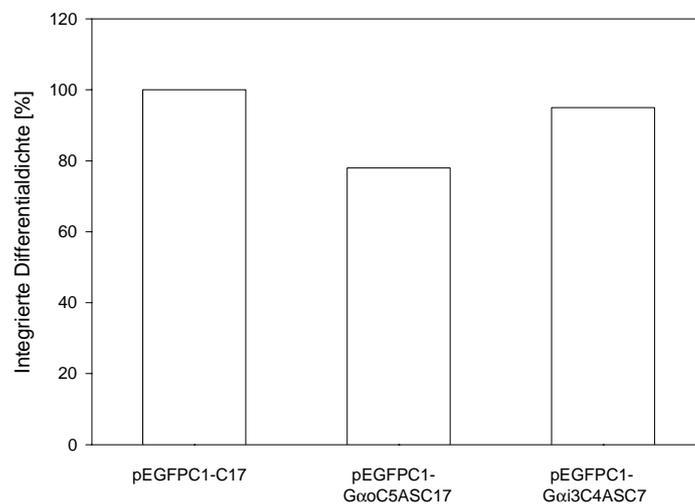


Abbildung 3.22.b: Prozentuale Evaluation der Antisense-Proteinreduktion

Säule 1: Stabil transfizierter pEGFPC1- INS-1 Einzelzellklon C17, Säule 2: Stabil transfizierter pEGFPC1- $G\alpha$ C5AS INS-1 Einzelzellklon C17, Säule 3: Stabil transfizierter pEGFPC1- $G\alpha$ i3C4ASC7 INS-1 Einzelzellklon. Der Vergleich zwischen dem Kontrollklon pEGFPC1-C17 und dem pEGFPC1- $G\alpha$ C5ASC17 Klon zeigt eine nur geringe Reduktion der Proteinmenge, der Wert für die DID zeigt mit 78% im Vergleich zum Kontrollklon eine um 22% verringerte Proteinmenge. Die durch das Antisense-Fragment hervorgerufene Reduktion der Proteintranslation ist sehr gering. Der Vergleich zwischen dem pEGFPC1- Einzelzellklon C17 und dem pEGFPC1- $G\alpha$ i3C4AS INS-1 Einzelzellklon C7 zeigt keine Reduktion der $G\alpha$ Untereinheit, es kann somit bei der Reduktion der $G\alpha$ i3 Untereinheit in diesem Klon von einem spezifischen Effekt gesprochen werden. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass es bei Reduktion der Proteinmenge für $G\alpha$ i3 zu keiner kompensatorisch verstärkten Proteinexpression der $G\alpha$ -Untereinheit in dem Einzelzellklon pEGFPC1- $G\alpha$ i3C4AS INS-1 Einzelzellklon C7 kommt. Der Nachweis einer kompensatorisch verstärkten Expression der $G\alpha$ i1- und $G\alpha$ i2-Untereinheit wurde mit diesem Klon nicht durchgeführt.

3.7. Analyse der Proteinphosphorylierung in stimulierten INS-1-Zellen

Der Fokus dieser Untersuchung lag auf der Proteinphosphatase 2B, dem Calcineurin und auf den als SNARE bezeichneten Proteinen, die am Mechanismus der Vesikelfusion in Neuronen beteiligt. Es wird vermutet, dass die SNARE-Proteine an der Insulinfreisetzung in β -Zellen beteiligt sind. INS-1 Zellen sollten nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen, die einen modulatorischen Effekt auf die Insulinsekretion haben, auf veränderte Reaktionen der Proteinphosphorylierung an Phosphoserin- und Phosphothreoninseitenresten untersucht werden (vgl.: 2.1.4. Stimulation von INS-1 Zellen zur Analyse der Calcineurinphosphorylierung). Der Schwerpunkt der Untersuchung lag dabei auf einer möglichen Veränderung der Phosphorylierung bzw. der Dephosphorylierung des Calcineurins.

Proteine wurden nach Stimulation der INS-1-Zellen als Gesamtzellhomogenate über die SDS-PAGE und das Westernblotting auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Bevor jedoch mit der Analyse des Phosphorylierungsmusters von Calcineurin oder den Proteinen des SNARE-Komplexes begonnen werden konnte, sollte eine Etablierung der gegen Phosphoserin- bzw. Phosphothreoninreste gerichteten Antikörper im Westernblot durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden die stimulierten INS-1 Proteinproben mit zwei verschiedenen Antikörpern behandelt und das Proteinphosphorylierungsmuster auf Ähnlichkeiten untersucht. Der zuerst verwendete Antikörper 1C8 der Firma Biomol lieferte im Vergleich zum später verwendeten C4A3 ein sehr viel schwächeres Phosphorylierungsmuster (nicht gezeigt) und wurde nicht weiter verwendet.

Abbildung 3.23 zeigt verschiedene Proteinproben stimulierter INS-1 Zellen die mit dem gegen Phosphoserin-/Phosphothreoninreste gerichteten Antikörper Klon C4A3 inkubiert wurden. Nach basaler Stimulation der INS-1 Zellen durch Applikation einer 0.5 mM Glukoselösung erfolgte die Gabe einer 16.7 mM Glukoselösung, die 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin und 100 $\mu\text{mol/l}$ Tolbutamid enthielt (Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und stimuliert über die Aktivierung der PKA die Insulinsekretion. Tolbutamid bindet an den Sulfonylharnstoffrezeptor und schließt den mit diesem assoziierten ATP-abhängigen Kaliumkanal. Die daraus resultierende Depolarisation der Membran öffnet spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle, die wiederum durch den Ca^{2+} -Einstrom die Insulinsekretion stimulieren. Das Typ II-Pyrethroid Deltamethrin inhibiert die Proteinphosphatase Calcineurin). Gleichzeitig wurden Kontrollexperimente mit EGTA und Deltamethrin unter Kontrollbedingungen durchgeführt, um die Effekte unspezifischer von denen spezifischer Stimulation abgrenzen zu können. Zur Etablierung des Antikörpers C4A3 gegen Phosphoserin- bzw. Phosphothreoninreste wurde der Antikörper zuerst mit unstimulierten INS-1 Zellen getestet. Nach Etablierung der Phosphoserin-/Phosphothreoninantikörper im Westernblot sollte dann die Analyse des Proteinphosphorylierungsmusters von Calcineurin und den den SNARE-Komplex bildenden Proteinen durchgeführt werden. Es ergaben sich jedoch bereits zu

Beginn der Experimente trotz stringenter Einhaltung der Protokolle Schwierigkeiten durch schwankende bzw. sich ständig ändernde Proteinphosphorylierungsmuster der INS-1 Zellen.

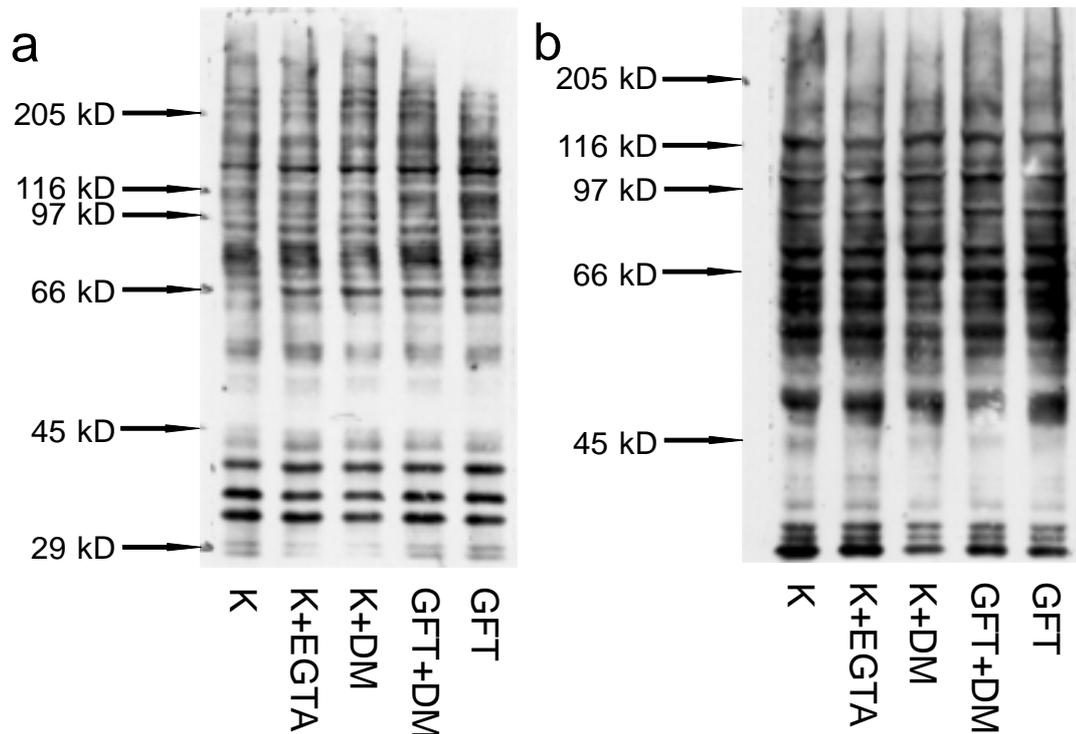


Abbildung 3.23: Analyse der Proteinphosphorylierung in INS-1 Zellen

INS-1 Zellen wurden nach Stimulation auf ein verändertes Proteinphosphorylierungsmuster untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Glukose (16.7 mM), Forskolin (5 µmol/l) und Tolbutamid (100µmol/l) stimuliert und das Proteinphosphorylierungsmuster im quantitativen Vergleich gegen Kontrollzellen (INS-1Zellen, die mit 0.5 mM Glukose und 0.1% DMSO inkubiert wurden) im Westernblot analysiert. Zur Analyse unspezifischer Effekte wurden Kontrollzellen zusätzlich mit dem Kalziumchelator EGTA und mit Kontrolllösung, die Deltamethrin (0.1 µM) enthielt, inkubiert. Die quantitativen Westernblots wurden mit dem Antikörper C4A3, der phosphorylierte Serin- bzw. Threoninseitenreste erkennt, inkubiert (Die Verdünnung des 1. Antikörpers betrug 1:5.000 (Klon C4A3, Biomol), die Verdünnung des zweiten Antikörpers lag bei 1:10.000 (HRP gekoppelter IGM µ chain specific, Sigma)). Der quantitative Vergleich der Proben zeigt geringe Veränderungen des Proteinsignals in der linken Abbildung. Da sich allerdings das Phosphorylierungsmuster der Proteine selbst trotz stringenter Einhaltung der angewendeten Protokolle nicht reproduzieren ließ, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Im Vergleich sieht man im rechten Teil der Abbildung Proteinproben stimulierter INS-1 Zellen, bei denen die Stimulationsdauer verlängert wurde. Trotz der verlängerten Stimulation wäre jedoch ein vergleichbares Muster phosphorylierter Proteine zu erwarten gewesen. Die Signale der an Serin- und Threoninseitenresten phosphorylierten Proteine läßt sich jedoch in keiner Weise zur Übereinstimmung bringen. K: Kontrolle , GFT: Glukose+Forskolin+Tolbutamid, DM: Deltamethrin

Trotzdem wurde versucht, INS-1 Zellen auf ein verändertes Proteinphosphorylierungsmuster der Proteinphosphorylierung an Serin- und Threoninseitenresten zu untersuchen. Da die Proben der stimulierten INS-1 Zellen selbst bei Verwendung der gleichen Proteinproben und bei stringenter Anwendung der Protokolle jedoch ständig sich ändernde Proteinphosphorylierungsmuster zeigten, wurde dieser Ansatz der Phosphorylierungsstudien bereits im Frühstadium abgebrochen und verworfen.

4. Diskussion

4.1. Planung der spezifischen und selektiven Proteinrepression unter Verwendung der Antisense-Technik

4.1.1. Die Antisense Technik als Methode zur funktionellen Proteinanalyse

Die Antisense-Technologie, die aus der Entwicklung gentherapeutischer Ansätze ^(132, 133) zur Bekämpfung aberranter Proteine entstanden ist, wird mittlerweile verwendet, um durch das Ausschalten spezifischer Proteine deren physiologische Funktion in der Zelle zu analysieren. Als Antisense-Strang bezeichnet man dabei einen einer mRNA eines Proteins komplementären RNA- oder DNA-Strang, der bei Hybridisierung mit seinem Komplementärstrang zur Repression des Proteins führt. Abschnitte des komplementären Antisense-DNA-Stranges können in Form von Antisense-Oligonukleotiden oder vektorieller DNA von außen den Zellen zugesetzt werden und dann eine transiente (vorübergehende) Repression des Zielproteins bewirken ^(134, 135, 136, 137, 138, 139). Die Etablierung stabiler Zelllinien, in denen die Antisense-DNA permanent in das Genom integriert wird, ist jedoch nur mit vektoriell eingebrachter DNA möglich, da selbst Phosphorothioat-modifizierte Antisense-Oligonukleotide nicht in das zelluläre Genom integriert und nach kurzer Zeit in der Zelle abgebaut werden ⁽¹⁴⁰⁾. Bei vektorieller Einbringung wird die der mRNA des Zielproteins komplementäre DNA in umgekehrter Orientierung (Antisense-Orientierung) downstream eines starken Promotors kloniert. Dabei werden entweder Teile des Gens oder das gesamte Gen als „Flipped Gene“ in Antisense-Orientierung in den Vektor kloniert (Abbildung 5.1.).

Die Suppression der Genexpression kann entweder auf der Ebene des Genoms, d.h. bei der Transkription, oder auf der Ebene der Proteinexpression, d.h. auf der Ebene der mRNA bzw. bei der Translation, erfolgen. Die Genexpression eines bestimmten Gens kann durch die sogenannte Triplexbildung – die Addition eines dritten Stranges in die große Furche der DNA-Doppelhelix – erfolgen, wodurch die Transkription von Genabschnitten verhindert werden kann ^(141, 142, 143).

Auf der Ebene der Translation kann die Proteinrepression erfolgen, indem die Zellen entweder mit Phosphorothioat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden ^(144, 136) oder mit Vektoren, die eine der mRNA des Zielproteins komplementäre Sequenz enthalten, transfiziert werden (Abbildung 5.1.) ^(145, 146). Antisense-Oligonukleotide hybridisieren nach Aufnahme in die Zelle mit der komplementären Sequenz des Zielproteins, destabilisieren die mRNA durch die Bildung von DNA/mRNA-Hybridmolekülen und verhindern die Translation durch die Blockierung des Ribosoms ⁽¹⁴⁷⁾. Die ubiquitär existierende Ribonuklease H (RNase H) greift dann die doppelsträngigen DNA/mRNA-Hybridmoleküle an und baut den mRNA-Anteil ab ⁽¹⁴⁸⁾.

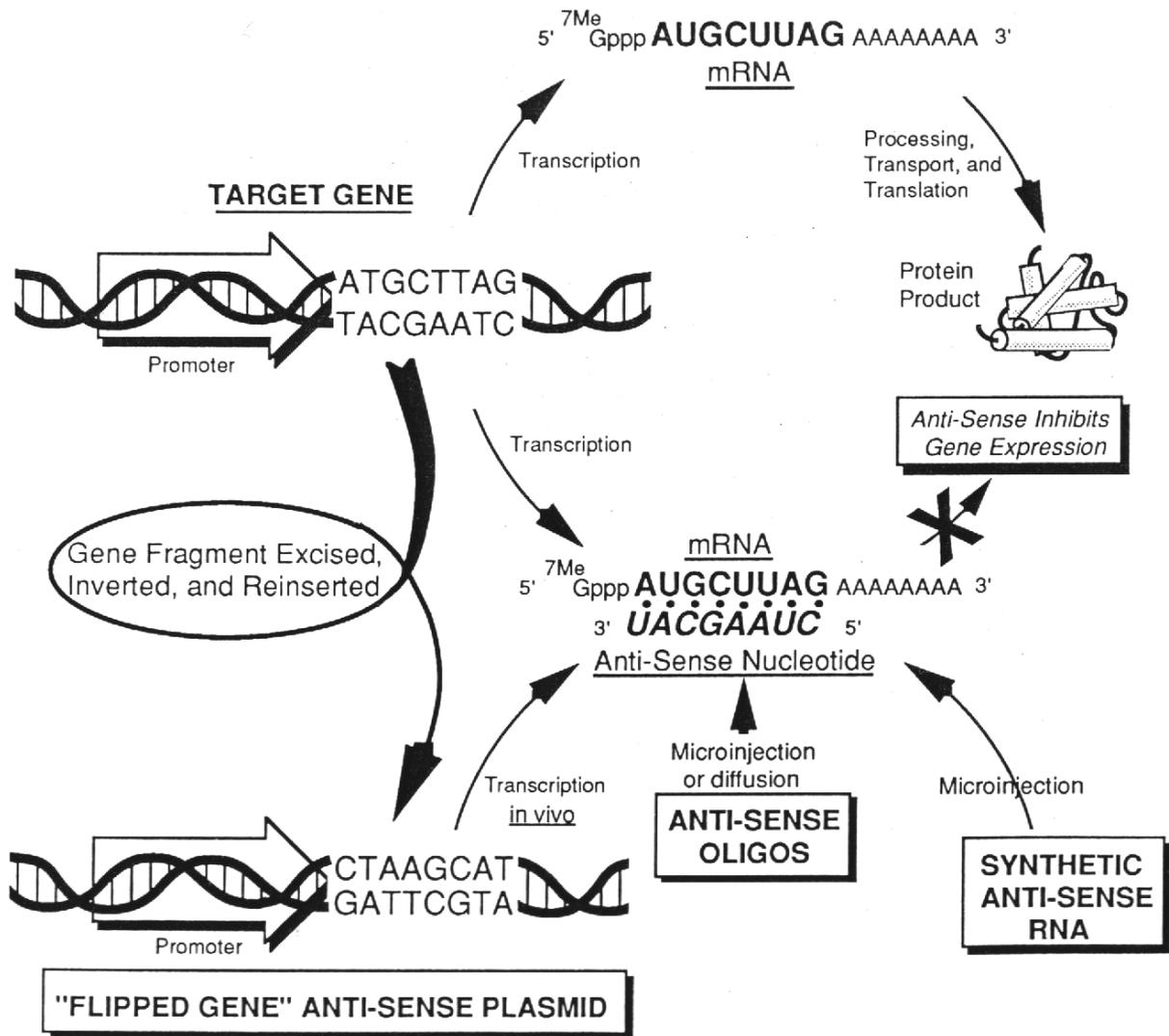


Abbildung 4.1.: Mechanismus der Wirkungsweise von Antisense-DNA

Bei Ableseung des Target-Gens kommt es nach Anheftung des Ribosoms an die Kozak-Sequenz der mRNA zur Proteintranslation. Antisense-Sequenzen werden hergestellt, indem die Sequenz des „Target-Gens“ in umgekehrter oder invertierter 5'-3'- Orientierung downstream eines Promotors kloniert werden. Bei Ableseung dieser invertierten Gensequenz („Flipped Gene“) wird der zur Sequenz des Target-Gens komplementäre Strang synthetisiert. Dieser komplementäre Antisense-mRNA-Strang bindet spezifisch an den mRNA-Strang des Target-Gens und verhindert so durch die Doppelsträngigkeit über die Blockierung des Ribosoms die Ableseung und damit die Proteintranslation bzw. dessen Synthese. Antisense-Moleküle können auch in Form kurzer, modifizierter Antisense-Oligonukleotide (Antisense-Oligos) dem Medium zugesetzt werden. Sie werden dann über Endozytose (bzw. Pinozytose) von den Zellen aufgenommen, hybridisieren mit der mRNA des Target-Gens und inhibieren ebenfalls über die Blockierung des Ribosoms die Proteinsynthese. Eine weitere Möglichkeit der Antisense-Applikation ist die der Mikroinjektion, der direkten Injektion synthetischer Antisense-RNA in die Zelle (nach Izant 1989, modifiziert)⁽¹⁴⁹⁾.

Ein zusätzlicher Mechanismus, der bei der Verwendung modifizierter Antisense-Oligonukleotide eine entscheidende Rolle spielt, ist die Wirkung der RNase H, einem Enzym, welches intrazellulär ubiquitär existiert, den RNA-Anteil doppelsträngiger DNA/mRNA-Hybridmoleküle angreift und diesen degradiert (nicht dargestellt).

Nach der Degradation des mRNA-Anteils liegt das Antisense-Oligonukleotid in ursprünglicher, einsträngiger Form vor und kann erneut mit einem mRNA-Strang hybridisieren. Der Nachteil der Antisense-Oligonukleotide liegt darin, dass mit diesen keine stabil transfizierten Zelllinien etabliert werden können und sie, trotz Stabilisierung durch

Phosphorothioat-Modifikationen der Oligonukleotide, nach kurzer Zeit durch Exo- bzw. Endonukleasen angegriffen und abgebaut werden.

Bei der Verwendung vektoriell eingebrachter Antisense-DNA-Fragmente liegt der Vorteil darin, dass durch eine Kopplung an Reportergene und Antibiotikaresistenzen sowohl eine transiente als auch eine stabile Transfektion der Zellen mit Antisense-DNA erreicht werden kann. Vektoren als Träger für die Antisense-DNA-Fragmente werden in die Zellen eingeschleust und von diesen zufallsbedingt in das Genom integriert. Je nach Ort der Insertion erfolgt eine stärkere oder schwächere Expression des Antisense-DNA-Fragmentes. Durch die Überexpression der Antisense-mRNA wird die Prozessierung und Stabilität der Ziel-mRNA verringert. Die exprimierten Antisense-mRNA-Stränge verhindern die Proteintranslation des Zielmoleküls dann durch die Blockierung des Ribosoms, der zelluläre Gehalt des bereits exprimierten Proteins wird durch den metabolischen Abbau reduziert ⁽¹⁵⁰⁾. Die Expression des Antisense-DNA-Fragmentes könnte dann z.B. durch die Koppelung an ein Reportergen, wie z.B. das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) über die Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine weitere Koppelung des Antisense-DNA-Fragmentes an eine Antibiotikaresistenz wie z.B. G418 würde dann eine Selektion der transfizierten Zellen mittels Antibiotika-Applikation ermöglichen. Sowohl in der Vielzahl der Kopplungsmöglichkeiten als auch in der gleichzeitigen Durchführung sowohl transienter als auch stabiler Antisense-Transfektionen liegt der große Vorteil der Anwendung und Einbringung Vektor-gekoppelter Antisense-DNA ^(151, 152).

Die Analyse und Auswertung Antisense-transfizierter Zellen kann sowohl bei der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden als auch bei der Verwendung von Vektoren als Trägern durch elektrophysiologische Messungen und durch proteinbiochemische Analysen (SDS-PAGE/Westernblot) erfolgen. Eine Koppelung der Antisense-DNA-Fragmente an verschiedene andere Komponenten (Antibiotikaresistenzen, Reportergene) und die parallele Durchführung transienter und stabiler Antisense-Transfektionen ist jedoch nur bei der Verwendung von Vektoren möglich.

4.1.2.Wahl des Antisense-Ansatzes

Bei Anwendung der Antisense-Technik ist sowohl die Wahl der Antisense-Methode als auch die Wahl der Antisense-Fragmente für die erfolgreiche Repression des gewählten Targetproteins von entscheidender Bedeutung. Neben der Spezifität der gewählten Antisense-Sequenz ist auch die Stabilität der Antisense-Fragmente sowie die Bildung möglicher Antisense-Sekundärstrukturen zu berücksichtigen. Ebenso ist der Mechanismus der Aufnahme des Antisense-Fragments in die Zelle und die anschließende Hybridisierung mit der mRNA des Proteins, welches reprimiert werden soll, von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Repression.

Der Antisense Ansatz für die Durchführung der Experimente sollte so gewählt werden, dass

sowohl stabile als auch transiente Transfektionen möglich sind, eine spezifische Repression eines Proteins selektiv erreicht werden kann und elektrophysiologische, proteinbiochemische Analysen und Insulin-Sekretionsstudien durchgeführt werden können. Diese Kriterien erforderten eine Koppelung der gewählten Antisense-DNA an ein Reporter-gen zur Visualisierung über die Fluoreszenz der transfizierten Zellen ⁽¹⁵³⁾. Ebenso war eine Koppelung der Antisense-DNA an eine Antibiotikaresistenz zur Selektion stabil transfizierter Zellen notwendig. Durch die Koppelung würde eine doppelte Selektionsmöglichkeit positiver Klone zum einen über die Fluoreszenz (nach 1 - 2 Tagen) und zum anderen über die Selektion mittels Antibiotika (Geneticin) geschaffen werden. Aufgrund dieser Anforderungen schied die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden aus.

Zur Durchführung der Antisense-Experimente wurde der Vektor pEGFP (Clontech, Heidelberg) verwendet. Dieser enthält ein für das EGFP-Protein kodierendes Gen und die Antibiotikaresistenzen für Kanamycin und Geneticin. Die Antisense-Fragmente sollten downstream in die MCS des EGFP-Gens ligiert, bei Expression zu einer – aus EGFP und Antisense-Sequenz bestehenden - Fusions-mRNA und bei Translation zu einem fluoreszierenden EGFP-Antisense-Fusionsprotein führen. Durch diesen Ansatz sind sowohl transiente als auch stabile Transfektionen durchführbar, die Fluoreszenz dient als Marker für die Expression der EGFP-Antisense-mRNA und die transfizierten Zellen können über das Antibiotikum Geneticin als stabile Zellklone selektioniert werden.

4.1.3.Wahl der Antisense-Sequenzen

Die Wahl der Antisense-Sequenzen sollte so getroffen werden, dass eine möglichst effiziente Repression des Proteins erzielt wird. Daher wird bei der Durchführung von Antisense-Experimenten im allgemeinen der Bereich um das Startkodon und die umgebende Region zur Repression des Proteins gewählt. Da bei der Hybridisierung des Antisense-Stranges mit der mRNA des Proteins sowohl die partielle Proteintranslation als auch das Ribosom selber blockiert wird, würde diese Antisense-Sequenz die effektivste Repression des Proteins bewirken.

Wird bei der Applikation von Antisense-Oligonukleotiden nur ein kurzes Phosphorothioat-modifiziertes Fragment von bis zu 30 Basenpaaren verwendet, so ist man mittlerweile dazu übergegangen, bei der vektoriellen Einbringung neben kürzeren Antisense-Fragmenten das gesamte Gen in Antisense-Orientierung („Flipped Gene“) für die Proteinrepression zu verwenden. Die Verwendung kürzerer Antisense-Fragmente hat den Vorteil, dass die Möglichkeit der Bildung von Sekundärstrukturen reduziert wird. Bei Verwendung längerer Antisense-Sequenzen ist die Repression des Proteins im allgemeinen effektiver.

4.1.4. Analyse der DNA/RNA Sekundärstrukturen

DNA wie RNA-Strukturen können bei intramolekularen Sequenzhomologien sogenannte Haarnadel- (Hairpin) oder Schleifenstrukturen (Loop) ausbilden ⁽¹⁵⁴⁾. Ebenso kann es zur Dimerisierung, einer Zusammenlagerung zweier DNA/RNA-Stränge, kommen. All diese Probleme sind auch beim Entwurf von Primern für die PCR bekannt. Die Möglichkeit der Ausbildung solcher Sekundärstrukturen steigt mit der Länge der verwendeten Antisense-Sequenzen. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu minimieren, werden deshalb kürzere DNA-Fragmente für die Durchführung der Antisense-Experimente verwendet.

4.1.5. Antisense induzierte G-Protein-Repression

Um die physiologische Bedeutung der G-Proteine bei verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, die in der INS-1 Zelle die Insulinsekretion regulieren, zu untersuchen, wurde die Expression der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ inhibiert. Durch den gewählten Antisense-Ansatz sollten sowohl transiente Transfektionen als auch die Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie ermöglicht werden. Außerdem sollte innerhalb eines Zeitraumes von 48 - 72 Stunden eine Identifizierung und eine Unterscheidung von transfizierten und nicht transfizierten Zellen durch das entwickelte Konstrukt ermöglicht werden. Dies wurde durch die Verwendung eines, ein Reporter gen enthaltenden Vektors (pEGFPC1) ermöglicht. Zusätzlich sollte das Verhältnis von spezifisch bindender Antisense-mRNA zu einem unspezifisch bindenden Anteil möglichst gering gehalten werden. Eine weitere Anforderung war, dass über die Antibiotikaresistenzen, die im Vektor integriert waren, eine Selektion nach bakterieller Transfektion sowie die Selektion stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone ermöglicht werden sollte. Zur Durchführung der Antisense-Experimente wird der Vektor pEGFPC1 ausgewählt, der neben dem Reporter gen EGFP das Gen für die Kanamycinresistenz für bakterielle Transformation und das Gen für die Genecitinresistenz für die Transfektion der Insulinomazelllinie INS-1 beinhaltet. Die Durchführung der Antisense-Experimente erfordert zuerst den Nachweis der Expression der verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ in INS-1 Zellen.

4.2. Nachweis der G-Proteine in INS-1 Zellen

Bevor die Antisense-Repression zur funktionellen Analyse der G-Proteine in INS-1 Zellen durchgeführt wird, erfolgt der Nachweis der PTX-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten auf der Translationsebene mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot und in immunocytochemischen Präparationen.

4.2.1. Nachweis im Westernblot

Über die Expression der PTX-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ in INS-1 Zellen sind keine Untersuchungen bekannt.

Die Analyse partikulärer Membranfraktionen von INS-1 Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper lieferte eindeutige Signale für zwei der vier G-Protein α -Untereinheiten. $G\alpha_i3$ und $G\alpha_o$ können sowohl mit Antikörpern der Firma Biomol als auch mit Antikörpern der Firma SCBT auf dem Westernblot im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 39 – 42 kD eindeutig nachgewiesen werden. $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ ergaben nur ein schwaches Signal oder sind gar nicht nachweisbar. Es ist denkbar, dass es sich bei den sehr schwach detektierbaren Proteinsignalen für $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ um mögliche Kreuzreaktionen der gegen $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ gerichteten Antikörpern mit den stark exprimierten Untereinheiten $G\alpha_i3$ und $G\alpha_o$ handelt. In Anbetracht der starken Sequenzhomologien der vier Untereinheiten ist eine Kreuzreaktion der Antikörper durchaus denkbar. Der eindeutige Nachweis für die Expression der $G\alpha_i1$ - und $G\alpha_i2$ -Untereinheiten ist aufgrund der starken Sequenzhomologie nur über die Durchführung einer Aminosäuresequenzierung (Dansyl-Edmann-Abbau) nach Isolation des Proteins aus SDS-PAGE-Gelen möglich.

Der Nachweis der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha_i3$ und $G\alpha_o$ in INS-1 Zellen deckt sich somit mit der Expression dieser Untereinheiten in pankreatischen β -Zellen (39, 48, 37, 49).

4.2.2. Nachweis mittels der Immuncytochemie

Immuncytochemisch präparierte und fixierte INS-1 Zellen, die mit den spezifischen G-Protein-Antikörpern (SCBT) behandelt wurden, belegen über die Fluoreszenz des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers die starke Expression der $G\alpha_i3$ - und $G\alpha_o$ -Untereinheit.

Die Behandlung der INS-1 Zellen mit $G\alpha_i1$ führte zu einer schwach roten Fluoreszenz, die auf eine schwache Expression oder aber eine mögliche Kreuzreaktion des $G\alpha_i1$ -Antikörpers mit $G\alpha_i3$ oder $G\alpha_o$ hinweist. Der Nachweis der Expression der $G\alpha_i1$ -Untereinheit ist in immuncytochemischen Präparaten nicht eindeutig. $G\alpha_i2$ konnte auch in den immuncytochemischen Präparaten nicht nachgewiesen werden.

Die starke Expression der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha_i3$ und $G\alpha_o$ ist somit sowohl in Westernblot-Analysen sowie in der Immuncytochemie nachgewiesen. Eindeutige Nachweise für die Expression von $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ konnten nicht erbracht werden.

Die Expression der G-Protein α -Untereinheiten entspricht den in der Literatur gemachten Angaben über die Expression der $G\alpha$ -Untereinheiten in β -Zellen (39, 48, 37, 49).

Da weitere Methoden (Co-Immunopräzipitation) in Kombination mit der Verwendung anderer Antikörper zum Nachweis von $G\alpha_i1$ und $G\alpha_i2$ in INS-1 Zellen angewendet werden sollten, wurden diese beiden Untereinheiten in alle weiteren Experimente mit einbezogen. Die Antisense-Repression der G-Proteine wurde mit allen vier G-Protein-Untereinheiten durchgeführt.

4.3. Repression der G-Proteine zur funktionellen Analyse

4.3.1. Repression der G-Proteine: Wahl des Antisense-Ansatzes

Mit den Antisense-Konstrukten sollten sowohl transiente als auch stabile Transfektionen der INS-1 Zellen durchgeführt werden.

Nachdem die Antisense-Sequenzen nach Analyse der Sequenzhomologien der PTX-sensitiven G-Proteine gewählt worden waren, wurden diese auf mögliche Sekundärstrukturen untersucht ⁽¹⁵⁴⁾. Die cDNA-Fragmente sollten nach Synthese mittels der PCR in Sense- und Antisense-Orientierung in einen Mammalia-Expressionsvektor kloniert werden ^(151, 152). Anschließend sollten INS-1 Zellen mit diesen Antisense-Konstrukten transfiziert werden. Zu diesem Zweck sollten die PCR-Produkte, nach Subklonierung in den pCR2.1TOPO-Vektor, zur leichteren Identifizierung der transfizierten INS-1 Zellen downstream eines Reportergens (EGFP) kloniert werden ⁽¹⁵³⁾.

Für diesen Ansatz kamen zwei Vektoren in Frage: Der bicistronische Vektor pIRES-EGFP und der Vektor pEGFPC1. Im pIRES-Vektor befindet sich upstream des EGFP-Gens eine sogenannte IRES-Sequenz (Intra Ribosomal Entry Site), eine intraribosomale Anheftungsstelle an der sich das Ribosom anheften und die Ablesung des nachfolgenden EGFP-Gens einleiten kann. Gleichzeitig trennt die IRES-Sequenz das EGFP-Gen von der MCS und ermöglicht bei Synthese eines mRNA-Stranges mit 2 Genen die unabhängige Ablesung bzw. Translation zweier verschiedener Gene (des EGFP-Gens und eines inklonierten Gens, welches untersucht werden soll). Für Antisense-Ansätze eignete sich dieser Vektor jedoch aus verschiedenen Gründen nicht: Die Koppelung an ein Reportergen (EGFP) war beabsichtigt. Die Klonierung der PCR-Produkte in Antisense-Orientierung in die MCS des pIRES-Vektors hätte jedoch zu einer unerwünschten Ablesung bzw. Translation der Antisense-Fragmente geführt. Ein weiterer Nachteil bei Verwendung des Vektors wäre die sehr lange mRNA gewesen, bestehend aus der mRNA des EGFP-Gens mit einer Länge von 761 Basenpaaren, der IRES-Sequenz mit einer Länge von 585 Basenpaaren und der gewählten Antisense-DNA. Die Länge der für die Antisense-Experimente ausgewählten DNA-Fragmente der verschiedenen G-Protein-Untereinheiten, betrug zwischen 415 und 588 Basenpaaren. Das Verhältnis zwischen unspezifischer IRES-EGFP- und spezifischer Antisense-Sequenz hätte damit je nach Antisense-Fragment bei 1:2,2 bis 1:3,1 gelegen. Der unspezifische mRNA-Anteil, der möglicherweise mit anderen mRNAs hätte interagieren können, lag damit viel zu hoch. Eine unerwünschte Reaktion bzw. ein unspezifischer Nebeneffekt der IRES-Sequenz hätte bei diesem Verhältnis von unspezifischer zu spezifischer DNA-Sequenz nicht ausgeschlossen werden können. Aus diesen Gründen wurde der pIRES-Vektor, der sich eher für die Koppelung eines zu analysierenden Gens an das Reportergen EGFP nicht aber für Antisense-Experimente eignet, verworfen.

Statt dessen fiel die Wahl auf den Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 von Clontech. Bei Koppelung der spezifischen Antisense-Sequenzen in die MCS downstream des EGFP-

Gens würde die Transkription zur Synthese von EGFP-Antisense-Fusions-mRNA und bei Translation zur Synthese eines fluoreszierenden EGFP-Antisense-Fusionsproteins führen. Dieser Ansatz ermöglicht sowohl transiente als auch stabile Transfektionen der INS-1 Zellen mit Antisense-Konstrukten.

4.3.2. Klonierung der Antisense-Konstrukte

4.3.2.1. PCR der Pertussistoxin-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten

Die PCR der PTX-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ wurde mit spezifisch gewählten Oligonukleotid-Primern durchgeführt, die PCR-Produkte wurden über spezifische enzymatische Analysen in verschieden große Fragmente zerlegt und so erstmalig auf DNA-Ebene identifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert und so erneut identifiziert. Die erhaltenen Sequenzen stimmten mit den Sequenzen der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha i1$, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ aus dem olfaktorischen Neuroepithel der Ratte überein ⁽⁴⁵⁾.

4.3.2.2. Subklonierung der PCR-Produkte

Die durch die PCR erhaltenen cDNA-Fragmente der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten wurden zur erleichterten Klonierung der Sense- und Antisense-Fragmente in den Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 zur Herstellung der Konstrukte zuerst in den pCR2.1.TOPO-Vektor kloniert. Nach Feststellung der Orientierung im Vektor pCR2.1TOPO erfolgte die Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pEGFPC1. Durch eine gezielte Wahl der Restriktionsenzyme konnte aus dem Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO sowohl das Sense- als auch das Antisense-Konstrukt im Eukaryontenexpressionsvektor pEGFPC1 hergestellt werden. Die Existenz der $G\alpha$ -Fragmente in Sense- sowie in Antisense-Orientierung downstream des EGFP-Gens wurde durch eine enzymatische Analyse belegt. Eine erneute Sequenzierung der Konstrukte wurde nicht durchgeführt.

4.4. Etablierung transienter INS-1 Mischzellklone

4.4.1. EGFP-Fluoreszenz als Beweis für die erfolgreiche Transfektion

INS-1 Zellen wurden durch Elektroporation mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert, die Fluoreszenz des EGFP-Proteins war 1-2 Tage nach Transfektion sichtbar. Zellzählungen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer belegten eine 30%ige Transfektionsrate bei Zellen die mit reinem pEGFPC1-Vektor transfiziert worden waren.

Die Analyse der elektroporierten INS-1 Zellen zeigte eine aus nicht fluoreszierenden INS-1 Zellen, die wahrscheinlich untransfiziert waren, und fluoreszierenden transfizierten INS-1 Zellen bestehende Kultur, die als Mischzellklone bezeichnet wurden. Auffällig war, dass die stärkste Fluoreszenz bei INS-1 Zellen auftrat, die mit dem reinen EGFP-Vektor transfiziert worden waren. Alle anderen mit den Antisense-Konstrukten transfizierten Mischzellklone

wiesen eine deutlich schwächere, manche gar keine Fluoreszenz auf. Es ist möglich, dass die Translation des Fusionsproteins bei den Antisense-Konstrukten zu einer veränderten Faltung des aus EGFP und Antisense bestehenden Proteins und damit zu einer verminderten Fluoreszenz führt. Die verringerte Fluoreszenz der mit Antisense-Konstrukten transfizierten INS-1 Zellen könnte allerdings auch ein Hinweis auf einen schwachen Antisense-Effekt sein. Die fehlende Fluoreszenz bei den Konstrukten pEGFPC1G α i1C2S, pEGFPC1G α OC5AS und pEGFPC1G α OC9S könnte auf eine falsche Faltung des Fusionsproteins hindeuten, sodass keine Fluoreszenz mehr emittiert werden kann.

4.4.2. Analyse der Proteinrepression transient transfizierter INS-1 Mischzellklone

Die transient transfizierten INS-1 Mischzellklone wurden nach vierwöchiger G418-Selektion als partikuläre Membranfraktionen im Westernblot quantitativ analysiert. Der Vergleich pEGFPC1 transfizierter INS-1 Kontrollmischzellen gegen die mit pEGFPC1G α i1C5AS, pEGFPC1G α i2C2AS und pEGFPC1G α i3C4AS transfizierten INS-1 Mischzellklone zeigte keine Reduktion des Proteingehaltes und damit keine Proteinrepression. Da keine Proteinrepression der G α -Untereinheiten zu erkennen war, wurde keine quantitative Auswertung der ECL-Folien vorgenommen

4.4.3. Insulinsekretionsstudien

Durch die Insulinsekretionsstudien, die mit Hilfe des Radioimmunoassays durchgeführt wurden, sollte ermittelt werden, ob bei den mit den Antisense-Konstrukten transfizierten INS-1 Zellen trotz der fehlenden G-Protein-Repression ein Effekt auf die Insulinsekretion nachzuweisen ist. Die Stimulation der Insulinsekretion mit 16.7 mM Glukose, 5 μ mol/l Forskolin und 100 μ mol/l Tolbutamid konnte in allen, den pEGFPC1-Kontrollmischzellklonen sowie den transient transfizierten INS-1 Antisense-Mischzellklonen (pEGFPC1G α i1C5AS, pEGFPC1G α i2C2AS und pEGFPC1G α i3C4AS) durch die Gabe von 1 μ mol/l Adrenalin inhibiert werden. Da die Inhibition der Insulinsekretion durch die PTX-sensitiven G-Protein α -Untereinheiten vermittelt wird, deutet die Tatsache, dass Adrenalin die Insulinsekretion immer noch zu inhibieren vermag, auf einen intakten Singalweg und damit auf eine fehlende Repression der G-Protein α -Untereinheiten. Die quantitativen Westernblots zur Analyse der Proteinrepression wurden zeitgleich mit den Insulinsekretionsstudien durchgeführt.

4.4.4. Ursachen für die fehlende Repression

Mögliche Ursachen für die fehlende Antisense-Repression der G-Protein α -Untereinheiten können im stärkeren Wachstum untransfizierter INS-1 Zellen und damit in der Maskierung des Antisense-Effekts oder in der Translation der EGFP-Antisense-mRNA liegen: Anhand der Fluoreszenz ist zu beobachten, dass Antisense transfizierte INS-1 Zellen verglichen mit untransfizierten langsamer wachsen. Ein Grund für die fehlende Repression könnte auch in

der Überwachung der Antisense-transfizierten Zellen durch die untransfizierten INS-1 Zellen liegen. Durch die schneller wachsenden untransfizierten INS-1 Zellen würde der Antisense-Effekt und somit die Proteinrepression maskiert.

Wie hoch die tatsächliche Expression der EGFP-Antisense-Fusions-mRNA in den 30% der transfizierten INS-1 Zellen war, konnte nur anhand der Fluoreszenz ermittelt werden: Bei nicht fluoreszierenden Zellen musste davon ausgegangen werden, dass die Zellen das Konstrukt nicht aufgenommen hatten, bei schwach fluoreszierenden Zellen konnte daher auch nur von einer schwachen Expression des Antisense-Fragmentes ausgegangen werden. Die starke Fluoreszenz weist auf die starke Expression der EGFP-Antisense-Sequenz hin, wobei eine starke Fluoreszenz auch einer starken Translation der EGFP-Antisense-mRNA entspricht. Hinzu kommt, dass nicht ermittelt werden konnte, wieviel Prozent der EGFP-Antisense-mRNA zum EGFP-Antisense-Fusionsprotein translatiert wird und die Fluoreszenz verursacht und wieviel der EGFP-Antisense-mRNA für die Hybridisierung mit der Ziel-mRNA des zu reprimierenden Proteins übrig bleibt. Die starke Translation der EGFP-Antisense-mRNA führt möglicherweise zum Verlust des Antisense-Stranges für die Hybridisierung mit dem komplementären Sense-Strang der zu reprimierenden Ziel-mRNA. Dies könnte ein weiterer Grund für die fehlenden Repression sein.

In nachfolgenden Antisense-Experimenten wurde durch Entfernung des EGFP-Gens mit Kozak-Sequenz und Startkodon (über die beiden kompatiblen Restriktionsenzyme AgeI und BspEI) aus dem Vektor pEGFPC1, überprüft, ob die fehlende Repression in der starken Translation der EGFP-Antisense-mRNA begründet ist. Der Vektor und die Antisense-Konstrukte wurden nach dem Entfernen des EGFP-Gens als EGFP-negativer Vektor mit einem Minuszeichen (pEGFPC1-) versehen.

4.5. Etablierung und Analyse stabiler INS-1 Einzelzellklone

4.5.1. Der Mischzellklon pEGFPC1-G α i3C4AS

Nach Entfernen des EGFP-Gens wurden INS-1 Zellen mit den EGFP-negativen Antisense-Konstrukten transfiziert und im Gegensatz zu den Mischzellen des ersten Antisense-Ansatzes direkt am nächsten Tag nach der Transfektion mit Geneticin (G418) behandelt. Dadurch sollte das mögliche Überwachsen der transfizierten durch untransfizierte Zellen unterbunden werden. Die Analyse des mit pEGFPC1-G α i3C4AS transient transfizierten INS-1 Mischzellklons zeigte auf Proteinebene eine deutliche Reduktion des G α i3-Gehaltes um 54.5% auf 45.5% und damit eine deutliche G α i3-Repression in den Mischzellklonen nach zweiwöchiger Geneticin-Selektion. Die Repression der G α i3-Untereinheit in INS-1 Mischzellklonen war ein erster Beweis für Theorie, dass bei direkter Koppelung der Antisense-Sequenzen an das Reportergen EGFP die Translation der EGFP-Antisense-

mRNA zu einem zu hohen Verlust der mRNA und damit möglicherweise nur zu einer sehr geringfügigen Repression führt, die im Western nicht nachweisbar ist.

4.5.2. Etablierung und Analyse stabiler INS-1 Einzelzellklone

INS-1 Zellen wurden erneut mit den EGFP-negativen Antisense-Konstrukten transfiziert, über einen Zeitraum von 4 Monaten über Geneticin-Behandlung (G418) selektioniert und so als stabile INS-1 Einzelzellklone etabliert. Die Analyse von 96 selektionierten G418-resistenten Klonen führte zur Etablierung von zwei stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklonen, in denen $G\alpha 3$ (pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C1 und C7) und einem Einzelzellklon in dem $G\alpha o$ reprimiert war (pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ Einzelzellklon C17).

Die beiden Einzelzellklone pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C1 und C7 wiesen eine unterschiedlich starke Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheiten auf. Die quantitative Analyse des pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklons C1 zeigte eine geringe Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheit um 8% auf 92%, der $G\alpha 3$ -Gehalt im pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C7 war um 71.2% auf 28.8% reduziert. Die Repression der $G\alpha o$ -Untereinheit lag im Einzelzellklon pEGFPC1- $G\alpha oC5AS$ Einzelzellklon C17 relativ niedrig; der $G\alpha o$ -Gehalt war nur um 22% auf 78% verringert. Die Analyse der spezifischen Repression zeigte eine nur sehr geringfügige Veränderung des $G\alpha o$ -Gehaltes im pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C7. Dies war ein Beweis für die spezifische Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheit in diesem Einzelzellklon. Da die Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheit im Klon pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelzellklon C7 am stärksten waren und die $G\alpha o$ -Repression als zu geringfügig betrachtet wurde, wurden daher alle weiteren Studien mit den beiden stabil transfizierten Klonen pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C1 und C7 durchgeführt.

4.5.3. Insulinsekretionsstudien der $G\alpha 3$ -reprimierten INS-1 Einzelzellklone

Nach Etablierung der beiden stabilen INS-1 Einzelzellklone (pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C1 und C7) wurden erneut Insulinsekretionsstudien durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheit in diesen Klonen auf die Insulinsekretion auswirkt. Die Stimulation der Insulinsekretion mit 16.7 mM Glukose und 5 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin konnte in beiden Einzelzellklonen durch die Gabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin inhibiert werden.

In den beiden stabilen INS-1 Zellklonen pEGFPC1- $G\alpha 3C4AS$ Einzelklon C1 und C7 wurde die $G\alpha 3$ -Untereinheit reprimiert. Die Repression der $G\alpha 3$ -Untereinheit war im Klon C1 (Reduktion auf 92%) geringer als im Klon C7 (Reduktion auf 28.8%). Bei einer Involvierung der $G\alpha 3$ -Untereinheit in die Inhibition der Insulinsekretion, hätte zumindest bei Klon C7, bei dem die $G\alpha 3$ -Untereinheit um über 70% reduziert ist, mit der Aufhebung des durch Adrenalin vermittelten inhibitorischen Effektes der Insulinsekretion gerechnet werden

können. Die Tatsache, dass Adrenalin die Insulinsekretion in den stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklonen immer noch zu inhibieren vermag, zeigt, dass $G\alpha_3$ keinen Einfluss auf die Insulinsekretion in INS-1 Zellen hat. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition der Insulinsekretion in INS-1 Zellen nicht durch die $G\alpha_3$ -Untereinheit vermittelt wird.

4.6. Analyse der Phosphorylierungsstudien

Ziel der Phosphorylierungsstudien war es, zuerst einen Antikörper im Westernblot zu etablieren, mit dem die Phosphorylierung von Proteinen an Serin- und Threoninresten phosphorylierter Proteine untersucht und quantifiziert werden konnte. Anschließend sollten dann INS-1 Zellen mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen stimuliert und mögliche Veränderungen im Phosphorylierungsmuster der möglicherweise an der Insulinsekretion beteiligten Proteine Calcineurin und der Komponenten des SNARE-Komplexes untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden mehrere gegen Phosphoserin- und Phosphothreoninreste gerichtete Antikörper getestet. Bei diesen ergaben sich jedoch schon zu Beginn der Experimente die Probleme, dass die Antikörper im Vergleich kein einheitliches und reproduzierbares Phosphorylierungsmuster im Westernblot zeigten. Die Analyse des Proteinphosphorylierungsmusters stimulierter INS-1 Zellen mit dem C4A3-Antikörper lieferte ebenfalls selbst bei strikter Einhaltung der experimentellen Versuchsprotokolle keine reproduzierbaren Ergebnisse. Da die Reproduktion der Ergebnisse mit den verwendeten Antikörpern sich als unmöglich erwies, wurden die Experimente schon im Anfangsstadium eingestellt. Eine Durchführung dieser Experimente mittels der radioaktiven Markierung erscheint erfolgversprechender.

4.7. Zusammenfassung

In INS-1 Zellen konnten die G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$ sowohl mittels Westernblot als auch in immunocytochemischen Präparationen von INS-1 Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von $G\alpha_1$ und $G\alpha_2$ konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden und die erhaltenen Signale könnten als Kreuzreaktion der $G\alpha_1$ - und $G\alpha_2$ -Antikörper mit den stark exprimierten $G\alpha_3$ und $G\alpha_0$ -Untereinheiten gedeutet werden. Die direkte Koppelung der Antisense-Fragmente an die EGFP-Kassette zeigt keine nachweisbare Repression in transient transfizierten INS-1 Mischzellklonen. Die Ursache dafür kann entweder auf eine zu geringe Transfektionsrate und eine Maskierung des Antisense-Effekts durch stärker proliferierende untransfizierte INS-1 Zellen zurückzuführen sein. Eine andere Erklärung dafür wäre der zu hohe Verlust der Antisense-EGFP-FusionsmRNA durch die Translation des Fusionsproteins belegt durch die Fluoreszenz der transient transfizierten INS-1 Mischzellklone. Beide Theorien scheinen durch das Entfernen des EGFP-Gens sowie durch die direkte Selektion der transfizierten Zellen einen Tag nach der

Transfektion durch Geneticin belegt. Sowohl direkt selektionierte INS-1 Mischzellklone als auch stabil transfizierte INS-1 Einzelzellklone, die mit gegen $G\alpha i3$ und $G\alpha o$ gerichtete Antisense-Sequenzen transfiziert worden waren, zeigten nach Entfernen des EGFP-Gens eine starke Repression der nachgewiesenen $G\alpha$ -Untereinheiten.

Die Tatsache, dass $G\alpha i3$ in stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklonen erfolgreich reprimiert wurde und die Repression keinen Effekt auf die Insulinsekretion hatte, ist ein Beweis dafür, dass die Inhibition der Insulinsekretion in INS-1 Zellen anders verläuft als angenommen. Somit konnte durch die im Verlauf der Arbeit durchgeführten Experimente gezeigt werden, dass die in INS-1 Zellen stark exprimierte $G\alpha i3$ -Untereinheit nicht in die Adrenalin-vermittelte Hemmung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion involviert ist. Die Funktion, die die $G\alpha i3$ -Untereinheit in INS-1 Zellen ausübt, muss noch weiter untersucht werden.

4.8. Ausblicke

Während der Durchführung der Antisense-Experimente und nach Entfernen des Reportergens EGFP aus dem Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 und dem damit verbundenen Verlust des Markers für transiente Transfektionen, wurde nach alternativen Wegen gesucht, die Expression von Antisense-Kassetten an die Expression des Reportergens zu koppeln, dabei aber die Translation der Antisense-Kassette zu vermeiden. Ein für diesen Ansatz in Frage kommendes System ist das pBiEGFP-Vektorsystem (Clontech), bestehend aus zwei verschiedenen Vektoren, dem pTET-OFF Vektor und dem pBiEGFP-Vektor. Der erste Vektor beinhaltet einen Tetracyclin-abhängigen Aktivator, der in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin exprimiert wird. Dieser bindet an das Tetracyclin Responsive Element (TRE) im bidirektionalen Promotor des zweiten Vektors und aktiviert damit die Expression zweier Komponenten. Upstream des Promotors ist das Reportergen EGFP und lokalisiert, downstream des Promotors eine MCS in die zu untersuchende Gene kloniert und so an die unabhängige Expression des EGFP gekoppelt werden können. In diese MCS können anstelle von zu untersuchenden Genen Antisense-Sequenzen inkloniert und zur Expression gebracht werden. Die Transfektion der INS-1 Zellen würde dann über zwei Schritte ablaufen. Im ersten Schritt müssten dann INS-1 Zellen zuerst stabil mit dem Vektor pTET-OFF-Vektor transfiziert werden. Diese würden dann selektiert und über einen weiteren Luciferase-Vektor nach Etablierung stabiler Einzelzellklone mittels G418 (Geneticin) identifiziert werden. Nach Etablierung stabiler pTET-OFF-INS-1 Einzelzellklone könnten diese dann mit dem zweiten, die Antisense-Kassette und das Reportergen enthaltenden Vektor pBiEGFP transfiziert werden. Im Gegensatz zu der Koppelung der Antisense-mRNA an das EGFP-Gen im pEGFPC1 wäre die Expression beider mRNAs im pBi-EGFP-Vektorsystem unabhängig voneinander.

Anfängliche Studien bei denen INS-1 Zellen parallel mit beiden Vektoren gleichzeitig transient transfiziert wurden, wiesen zwar eine sehr geringe Transfektionsrate auf, zeigten

aber auch, dass die Durchführung transienter Transfektionen nicht unmöglich ist. Die Transfektionsrate lag bei diesem Vektorsystem jedoch deutlich unter den mit pEGFPC1 erzielten 30%. Es wäre jedoch möglich stabile pTET-OFF INS-1 Einzelzellklone zu etablieren und anschließend mit dem pBiEGFP-Vektor, in dessen MCS sich eine gegen ein bestimmtes Protein gerichtete Antisense-Kassette befindet, anschließend stabil zu transfizieren. Damit wäre die Expression der Antisense-Kassette an die unabhängige Expression und Translation des EGFP-Gens gekoppelt. Ob sich mit diesem Vektorsystem auch transiente oder nur stabile Transfektionen durchführen lassen, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

5. Anhang

5.1. Fremdexperimente

5.1.1. Insulinsekretionsstudien transient transfizierter INS-1 Zellen

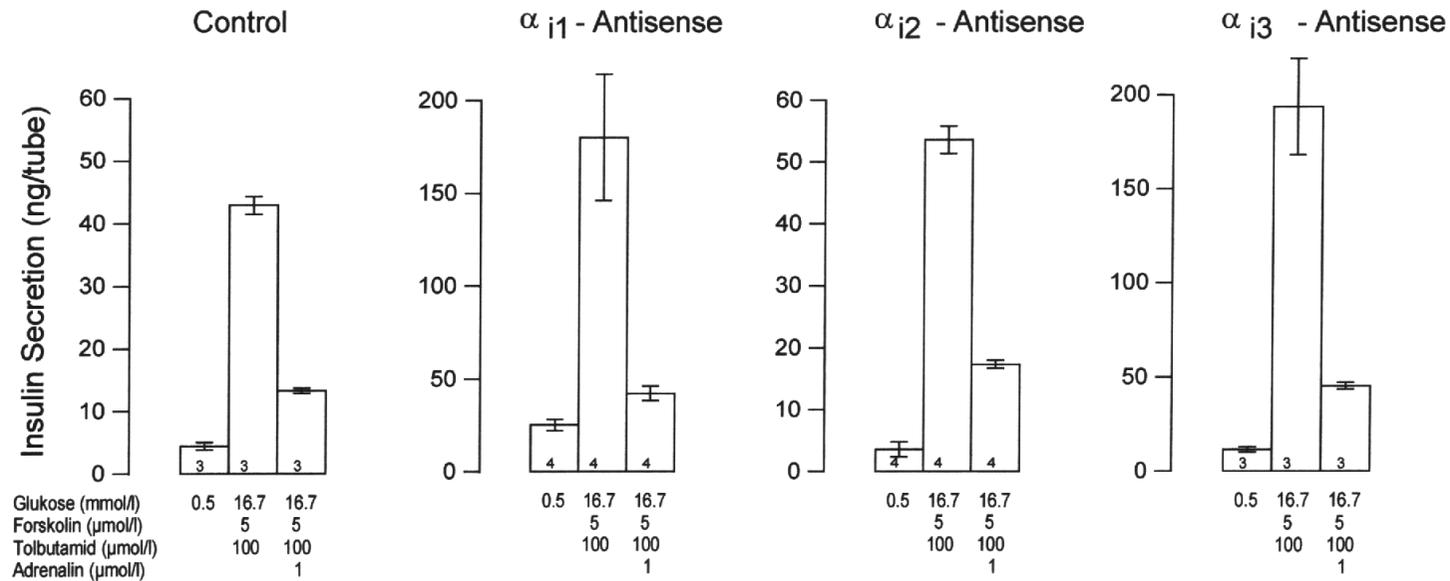


Abbildung 5.1.: Insulinsekretion transient transfizierter INS-1 Mischzellklone

Bestimmung der Insulinsekretion in mit Antisense-Konstrukten transfizierten INS-1 Mischzellklonen: INS-1 Zellen wurden mit den Antisense Konstrukten gegen $G\alpha i1$ (PEGFPC1 $G\alpha i1C5AS$), $G\alpha i2$ (PEGFPC1 $G\alpha i2C2AS$) und $G\alpha i3$ (PEGFPC1 $G\alpha i3C4AS$) transient transfiziert und die Insulinsekretion gegen die pEGFPC1 transfizierten Kontrollzellen gemessen. Die Mischzellklone wurden zuerst basal mit 0.5 mmol/l Glukose inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Insulinsekretion durch Erhöhung der Glukosekonzentration auf 16.7 mmol/l und der zusätzlichen Gabe von 5 μ mol/l Forskolin und 100 μ mol/l Tolbutamid. Forskolin stimuliert direkt die Adenylatzyklase, die Adenylatzyklase erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Das cAMP aktiviert wiederum die cAMP-abhängige PKA wodurch es zur Stimulation der Insulinsekretion kommt. Tolbutamid schließt K_{ATP} -abhängige K-Kanäle. Die Schließung der K_{ATP} -Kanäle führt zu einer Depolarisation der Membran, wodurch es zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle kommt. Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen ermöglichen nachfolgend die Insulinsekretion. Wenn Adrenalin seine Wirkung über die $G\alpha i$ -Untereinheiten entfaltet und die Repression der $G\alpha i$ -Untereinheiten ausreichend gewesen wäre, so hätte die Gabe des 1 mmol/l Adrenalin keine Auswirkung auf die Insulinsekretion haben dürfen. Da die Inhibition der Insulinsekretion durch Adrenalin jedoch immer noch vermittelt wird, kann davon ausgegangen werden, daß die Repression der G-Protein α -Untereinheiten zu schwach war (Rösler et al. 1999) ⁽¹⁵⁵⁾. Durchführung: Frau Carmen Ilgner

5.1.2. Insulinsekretionsstudien stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone

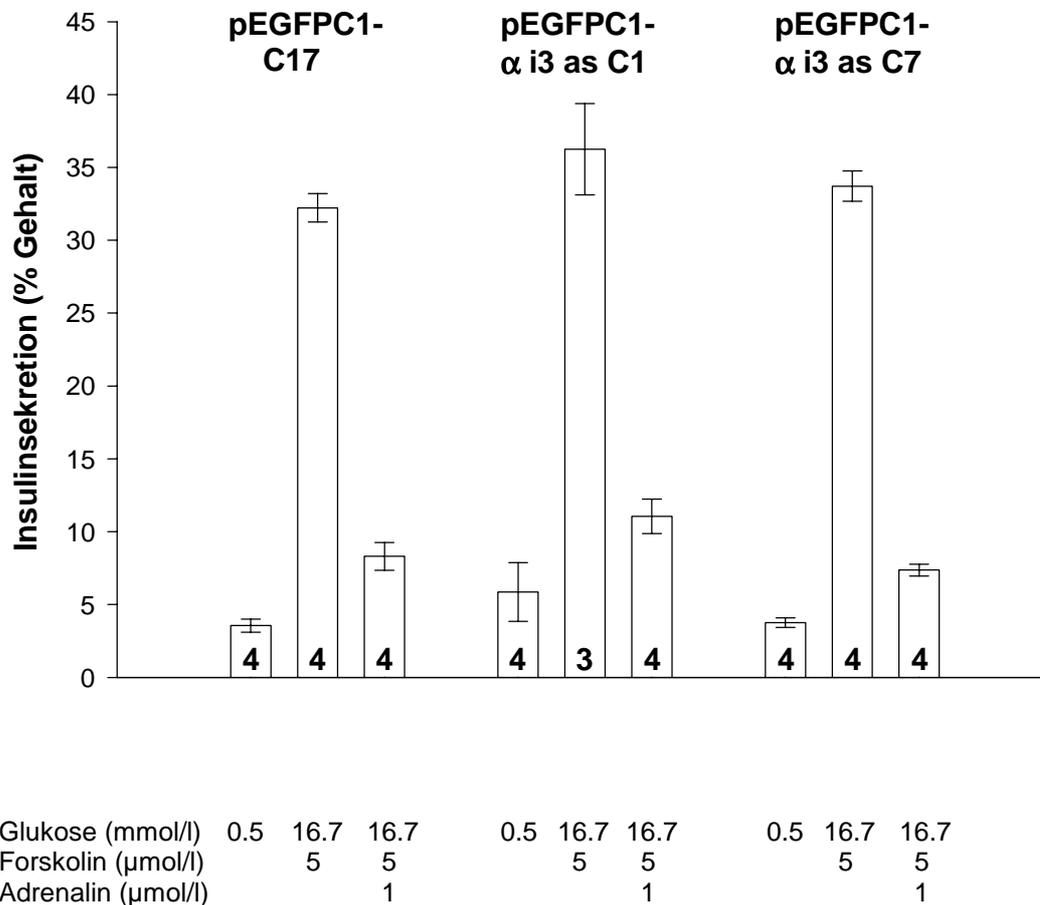


Abbildung 5.2.: Insulinsekretion stabil transfizierter INS-1 Zellen

Bei stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklonen, in denen die G-Protein α -Untereinheit $G\alpha i3$ reprimiert worden war, wurde die Insulinsekretion gegen pEGFPC1- transfizierte INS-1 Kontrollklone gemessen. Nach basaler Stimulation mit 0.5 mmol/l Glukose, erfolgte die Stimulation der Insulinsekretion mit 16.7 mmol/l Glukose und dem Stimulator der Adenylatzyklase Forskolin (5 μ mol/l). Die durch Adrenalin vermittelte Inhibition der Insulinsekretion ist auch bei den INS-1 Einzelzellklonen, bei denen die $G\alpha i3$ -Untereinheit erfolgreich reprimiert wurde vorhanden.

Durchführung : Frau Carmen Ilgner, mit freundlicher Genehmigung von S. Ullrich.

5.2. Sequenzhomologievergleich der G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ - Wahl der Antisense-Sequenzen

Abbildung 5.3.: Analyse der Sequenzhomologien und Wahl der spezifischen Antisense-Sequenzen der G-Protein α -Untereinheiten

Die Sequenzen der vier G-Protein α -Untereinheiten $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$ und $G\alpha o$ wurden vom Startkodon ausgehend gegeneinander ausgerichtet, um die Homologien zu analysieren und spezifische Antisense-Sequenzen für die selektive Repression jeder einzelnen G-Protein α -Untereinheit auszuwählen. Bei $G\alpha 1$ (M17527, Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA) wurde der Bereich von nt651 - nt1.217 (567bp), bei $G\alpha 2$ (M17528, Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA) der Bereich von nt743 - nt1.158 (415 bp), bei $G\alpha 3$ (M20713, Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA) der Bereich von nt450 - nt1.038 (588 bp) und bei $G\alpha o$ (M17526, Accession Nr. Genbank, NCBI Bethesda, USA) der Bereich von nt1.155 - nt1.740 (585 bp) ausgewählt. Die gelbe Markierung entspricht einer drei- bis vierfachen Homologie der Basen, rot markierte Sequenzabschnitte entsprechen zwei homologen Basen. Die grün unterlegten Bereiche zeigen die für die Antisense-Repression ausgewählten Bereiche der verschiedenen G-Protein α -Untereinheiten. Die fett und kursiv dargestellten Basen entsprechen den verwendeten Primern. Mit ihnen wurden die zur späteren Durchführung der Antisense-Experimente verwendeten Fragmente der G-Protein α -Untereinheiten amplifiziert.

$G\alpha$	Kozak-Seq.	Start				
i1	5'	CCACC	ATGGGCTGCA	CACTGAGCGC	TGAGGACAAG	3'
i2	5'	CAGG	ATGGGCTGCA	CCGTGAGCGC	CGAGGACAAG	3'
i3	5'	CCGTC	ATGGGCTGCA	CGTTGAGCGC	CGAGGACAAG	3'
O	5'	CCACC	ATGGGATGTA	CTCTGAGCGC	AGAGGAGAGA	3'
i1	30 bp	5'	GCGGCCTGTGG	AGCGCAGCAA	GATGATCGAC	3'
i2		5'	GCGGCAGCCG	AGCGCTCTAA	GATGATCGAC	3'
i3		5'	GCGGCGGTGG	AGCGGAGTAA	GATGATCGAC	3'
O		5'	GCCGCCCTCG	AGCGGAGCAA	GGCGATTGAG	3'
i1	60 bp	5'	CGCAACCTCC	GGGAGGACGG	AGAGAAGGCA	3'
i2		5'	AAGAACCTGC	GGGAGGACGG	CGAGAAGGCG	3'
i3		5'	CGCAACTTGC	GGGAGGACGG	AGAGAAAGCG	3'
O		5'	AAAAATCTCA	AAGAAGATGG	CATCAGCGCC	3'
i1	90 bp	5'	GCGCGCGAGG	TCAAGCTGCT	GCTGCTGGGT	3'
i2		5'	GCACGGGAGG	TGAAGTTGCT	TCTGTTAGGT	3'
i3		5'	GCCAAAGAAG	TGAAGCTGCT	GCTGCTCGGC	3'
O		5'	GCCAAAGACG	TGAAATTACT	CCTGCTGGG	3'
i1	120 bp	5'	GCTGGTGAAT	CCGGGAAGAG	CACAATTGTG	3'
i2		5'	GCTGGAGAAT	CAGGGAAGAG	CACCATCGTC	3'
i3		5'	GCTGGAGAAT	CTGGTAAAAG	TACTATTGTG	3'
O		5'	GCTGGAGAAT	CAGGAAAAG	CACCATTGTG	3'
i1	150 bp	5'	AAGCAGATGA	AAATTATCCA	CGAGGCTGGC	3'
i2		5'	AAGCAGATGA	AGATCATCCA	CGAGGATGGC	3'
i3		5'	AAACAGATGA	AAATCATTCA	TGAGGATGGC	3'
O		5'	AAGCAGATGA	AGATCATCCA	TGAAGATGGC	3'

i1	180 bp	5'	TACTCAGAGG	AAGAGGTAA	GCAGTACAAA	3'
i2		5'	TACTCAGAGG	AGGAGTGCCG	GCAGTACCGT	3'
i3		5'	TATTCCGAGG	ACGAGGTAA	GCAGTATAAA	3'
O		5'	TTCTCTGGAG	AAGACGTAAA	GCAGTACAAG	3'
i1	210 bp	5'	GCAGTGGTCT	ACAGCAACAC	CATCCAGTCC	3'
i2		5'	GCGGTGTCT	ACAGCAACAC	CATCCAGTCT	3'
i3		5'	GTGTCTCT	ACAGCAATAC	CATTCAGTCC	3'
O		5'	CCTGTCTCT	ACAGCAACAC	CATCCAGTCT	3'
i1	240 bp	5'	ATCATGCCA	TCATTAGAGC	CATGGGGAGA	3'
i2		5'	ATCATGCCA	TCCTCAAAGC	CATGGGCAAC	3'
i3		5'	ATCATGCCA	TCATAAGAGC	CATGGGACGG	3'
O		5'	CTGGCAGCCA	TTGTGCGGGC	CATGGATACT	3'
i1	270 bp	5'	TTGAAAATCG	ACTTTGGAGA	CGCTGCTCGT	3'
i2		5'	CTGCAGATCG	ACTTTGCTGA	CCCCAGCGT	3'
i3		5'	TTGAAGATTG	ATTTTGGGGA	AGCTGCCAGA	3'
O		5'	CTGGGCGTGG	AGTATGGTGA	CAAGGAGAGG	3'
i1	300 bp	5'	GCGGATGATG	CTCGCCAACT	CTTCGTGCTT	3'
i2		5'	GCGGATGATG	CCAGGCAGCT	GTTTCGCACTG	3'
i3		5'	GCGGATGATG	CCCGACAGTT	ATTTGTTTTA	3'
O		5'	AAGGCAGACT	CCAAGATGGT	GTGTGACGTG	3'
i1	330 bp	5'	GCTGGGGCTG	CAGAGGAAGG	CTTTATGACC	3'
i2		5'	TCCTGTGCTG	CCGAGGAGCA	AGGCATGCTT	3'
i3		5'	GCTGGCAGTG	CTGAGGAAGG	AGTCATGACT	3'
O		5'	GTGAGTCGCA	TGGAGGACAC	TGAACCATTC	3'
-----P1i3-f-----						
i1	360 bp	5'	GCGGAGCTCG	CCGGCGTCAT	AAAGAGACTG	3'
i2		5'	CCGGAAGACC	TGTCGGGCGT	CATCCGGAGG	3'
i3		5'	TCAGAACTAG	CAGGCGTGAT	TAAACGTTTA	3'
O		5'	TCTGCAGAAC	TGCTTTCTGC	CATGATGCGA	3'
i1	390 bp	5'	TGGAAGGACA	GCGGTGTGCA	AGCCTGCTTC	3'
i2		5'	CTCTGGGCTG	ACCATGGTGT	GCAAGCCTGC	3'
i3		5'	TGGCGAGATG	GCGGGGTGCA	GGCATGCTTC	3'
O		5'	CTCTGGGGCG	ACTCGGGGAT	CCAGGAGTGC	3'
-----P1i1-f-----						
i1	420 bp	5'	AACAGATCCC	GGGAGTACCA	GCTGAACGAT	3'
i2		5'	TTTGGCCGCT	CACGGGAATA	TCAACTCAAT	3'
i3		5'	AGCAGGTCCA	GGGAATATCA	GCTCAATGAT	3'
O		5'	TTCAACCGAT	CTCGGGAGTA	TCAGCTCAAC	3'
_*-----P1o-f-----*						
i1	450 bp	5'	TCGGCGGCGT	ACTACCTGAA	TGACTTGGAC	3'
i2		5'	GACTCAGCCG	CTTACTACCT	GAATGACCTG	3'
i3		5'	TCTGCTTCAT	ATTACCTAAA	TGATTTGGAT	3'
O		5'	GACTCTGCCA	AATACTACCT	GGACAGCTTG	3'

i1	480 bp	5′	AGAATAGCAC	AACCAAATTA	CATCCCAACC	3′
i2		5′	GAGCGCATAG	CACAGAGTGA	CTATATCCCT	3′
i3		5′	AGAATATCCC	AGACCAACTA	CATTCCAAC	3′
O		5′	GATCGGATTG	GAGCCGCTGA	CTACCAGCCC	3′
i1	510 bp	5′	CAGCAGGATG	TTCTCAGAAC	TAGAGTGAAA	3′
i2		5′	ACACAGCAGG	ATGTGCTGCG	GACCCGTGTG	3′
i3		5′	CAGCAAGATG	TTCTTCGGAC	GAGAGTGAAG	3′
O		5′	ACCGAGCAGG	ACATCCTCCG	AACCAGGGTC	3′
i1	540 bp	5′	ACGACGGGAA	TTGTGGAAAC	CCACTTTACT	3′
i2		5′	AAGACCACAG	GCATCGTCGA	AACACACTTC	3′
i3		5′	ACTACAGGCA	TTGTGGAGAC	CCACTTCACC	3′
O		5′	AAAACAAC	GCATCGTAGA	AACCACTTC	3′
					*---P1i2-f-	
i1	570 bp	5′	TTCAAAGATC	TTCATTTTAA	AATGTTTGAC	3′
i2		5′	ACCTTCAAGG	ACTTACACTT	CAAG GATGTTT	3′
i3		5′	TTCAAGGAGC	TCTACTTCAA	AATGTTTGAT	3′
O		5′	ACCTTCAAGA	ACCTCCACTT	CAGGCTGTTT	3′
					-----P1i2-f-----*	
i1	600 bp	5′	GTGGGAGGCC	AGAGATCAGA	GCGGAAGAAG	3′
i2		5′	GATGTGGGTG	GTCAGCGATC	TGAGCGGAAG	3′
i3		5′	GTAGGTGGCC	AAAGATCCGA	ACGGAAAAAG	3′
O		5′	GACGTTGGGG	GCCAGCGATC	TGAACGTAAG	3′
i1	630 bp	5′	TGGATTCACT	GCTTTGAAGG	CGTGACTION	3′
i2		5′	AAGTGGATCC	ACTGCTTTGA	GGGTGTCACG	3′
i3		5′	TGGATCCACT	GTTTTGAGGG	AGTGACAGCA	3′
O		5′	AAGTGGATCC	ACTGCTTCGA	GGATGTCACG	3′
i1	660 bp	5′	ATCATCTTCT	GTGTGGCCCT	GAGTGACTION	3′
i2		5′	GCCATCATCT	TCTGTGTCGC	CTTGAGCGCG	3′
i3		5′	ATTATCTTTT	GTGTGGCTCT	CAGTGATTAC	3′
O		5′	GCCATCATCT	TCTGTGTCGC	ACTCAGCGGC	3′
i1	690 bp	5′	GACCTGGTTC	TTGCTGAGGA	TGAAGAAATG	3′
i2		5′	TACGACTTGG	TGCTGGCTGA	GGATGAGGAG	3′
i3		5′	GACCTTGTTT	TGGCTGAGGA	CGAGGAAATG	3′
O		5′	TATGACCAGG	TGCTCCACGA	GGACGAAACC	3′
i1	720 bp	5′	AACCGGATGC	ATGAAAGCAT	GAAGCTGTTC	3′
i2		5′	ATGAATCGCA	TGCATGAGAG	CATGAAGCTG	3′
i3		5′	AACCGAATGC	ATGAAAGCAT	GAAATTGTTT	3′
O		5′	ACGAACCGCA	TGCACGAGTC	TCTCATGCTC	3′
i1	750 bp	5′	GATAGCATAT	GTAACAACAA	GTGGTTTACG	3′
i2		5′	TTTGATAGCA	TCTGCAATAA	TAAGTGGTTC	3′
i3		5′	GACAGCATTT	GTAACAACAA	ATGGTTTACA	3′
O		5′	TTCGACTCCA	TCTGTAACAA	CAAGTTTTC	3′

i1	780 bp	5'	GACACATCCA	TCATCCTTTT	CCTGAACAAG	3'
i2		5'	ACAGACACCT	CCATCATCCT	CTTCCTCAAC	3'
i3		5'	GACACTTCAA	TCATTCTCTT	CCTTAATAAG	3'
O		5'	ATCGATACCT	CCATCATTCT	CTTCCTCAAC	3'
i1	810 bp	5'	AAGGACCTCT	TCGAAGAGAA	GATCAAAAAG	3'
i2		5'	AAGAAGGACC	TGTTTGAAGA	GAAGATCACA	3'
i3		5'	AAAGACCTTT	TTGAGGAAAA	AATAAAGAGG	3'
O		5'	AAGAAAGACC	TCTTTGGCGA	GAAGATTAAG	3'
i1	840 bp	5'	AGTCCCCTCA	CGATATGCTA	TCCAGAATAT	3'
i2		5'	CAGAGCCCCC	TGACCATCTG	TTTCCCTGAG	3'
i3		5'	AGTCCATTA	CAATCTGTTA	TCCAGAATAC	3'
O		5'	AAGTCACCCT	TGACCATCTG	CTTTCCTGAA	3'
i1	870 bp	5'	GCAGGCTCAA	ACACATATGA	AGAGGCGGCT	3'
i2		5'	TACACAGGGG	CCAACAAGTA	TGACGAGGCA	3'
i3		5'	ACAGGTCCA	ATACGTACGA	AGAGGCAGCT	3'
O		5'	TACCCAGGCT	CCAACACCTA	TGAAGACGCA	3'
i1	900 bp	5'	GCGTATATCC	AGTGTCAGTT	TGAAGACCTC	3'
i2		5'	GCCAGCTACA	TCCAGAGCAA	GTTTGAGGAC	3'
i3		5'	GCTTACATCC	AGTGCCAGTT	TGAAGATCTG	3'
O		5'	GCTGCCTACA	TCCAAACACA	GTTTGAAAGC	3'
i1	930 bp	5'	AATAAAAGGA	AGGACACAAA	GGAAATTTAC	3'
i2		5'	CTGAATAAAC	GCAAAGACAC	CAAGGAGATC	3'
i3		5'	AACCGAAGAA	AGGACACCAA	GGAG GTCTAC	3'
O		5'	AAAAACCGCT	CACCCAACAA	AGAAATTTAC	3'
-----P2i3-r-----						
i1	960 bp	5'	ACCCACTTCA	CTTGCGCCAC	GGATACGAAG	3'
i2		5'	TACACGCACT	TCACATGCGC	CACCGACACC	3'
i3		5'	ACTCACTTTA	CCTGTGCCAC	TGACACCAAAA	3'
O		5'	TGTCACATGA	CTTGTGCCAC	AGACACGAAT	3'
-----P2i1-r-----						
*--						
i1	990 bp	5'	AATGTGCAGT	TTGTGTTCGA	TGCTGTAACG	3'
i2		5'	AAGAACGTGC	AGTTTGTG TT	TGATGCCGTC	3'
i3		5'	AACGTGCAGT	TTGTTTTTGA	TGCTGTTACA	3'
O		5'	AATATCCAGG	TGGTATTCGA	CGCCGTCACC	3'
---P2i1-r----*						
----- P2i2-r-----*						
-----P2o-r-----						
i1	1.020 kb	5'	GACGTCATCA	TAAAGAATAA	CCTAAAAGAC	3'
i2		5'	ACTGACGTCA	TCATCAAGAA	CAACCTGAAG	3'
i3		5'	GATGTCATCA	TTAAAAACAA	CTTAAAGGAA	3'
O		5'	GACATCATCA	TTGC CAACAA	TCTCCGGGGC	3'
-----P2o-r-----*						
i1	1.050 kb	5'	TGTGGTCTCT	TCTAA	3'	1.065 kb
i2		5'	GACTGTGGCC	TCTTCTGA	3'	1.068 kb
i3		5'	TGTGGGCTTT	ACTGA	3'	1.065 kb
O		5'	TGTGGCTTGT	ACTGA	3'	1.065 kb

5.3. Vektor und Fragmentberechnungen

5.3.1. Größe der Vektoren und Konstrukte

pEGFPC1	=>	4.731 kb		HindIII/XhoI	=	9 bp		HindIII/SmaI	=	36 bp
pCR2.1TOPO	=>	3.908 kb		HindIII/XhoI	=	100 bp		HindIII/EcoRV	=	79 bp
pCR2.1TOPO	=>	pEGFPC1		HindIII/XhoI	+	100 bp	-	9 bp	=	91 bp
				HindIII/SmaI (EcoRV)	+	79 bp	-	36 bp	=	43 bp

Tabelle 5.1.: Größenangaben in Kilobasen (kb) und Basenpaaren (bp) der ursprünglichen Vektoren und der hergestellten Konstrukte
 Die Tabelle zeigt Angaben zu den DNA-Größen der ursprünglichen Vektoren und gibt eine Übersicht darüber, wieviel Basen durch das Umklonieren der PCR-Produkte den Fragmenten hinzugefügt werden. Die Schnittstellen HindIII und XhoI liegen in der Multiple Cloning Site des pEGFPC1-Vektors 9 Basenpaare voneinander entfernt, der Abstand zwischen den Schnittstellen HindIII und SmaI beträgt im Vektor pEGFPC1 36 Basenpaare. Im Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO beträgt der Abstand zwischen den Restriktionsschnittstellen HindIII und XhoI in der Polylinkersite 100 Basenpaare und zwischen den Schnittstellen HindIII und EcoRV 79 Basenpaare. Beim Umklonieren der PCR-Fragmente aus dem Vektor pCR2.1TOPO in den Eukaryonten-Expressionsvektor werden bei Verwendung der Schnittstellen HindIII und XhoI dem Insert (PCR-Produkt) 91 Basenpaare und bei Verwendung der Schnittstellen HindIII/SmaI(EcoRV) 43 Basenpaare hinzugefügt. Bei der Umklonierung werden die PCR-Produkte also um 91 bzw. 43 Basenpaare größer

Vektor		Umkloniert über		pEGFPC1						EGFP-Gen		
										AgeI/BspEI		
pEGFPC1	Gαi1C2S	HindIII/EcoRV(SmaI)		4.731 kb	+	43 bp	+	567 bp	=	5.341 kb		
pEGFPC1	Gαi1C5AS	HindIII/XhoI		4.731 kb	+	91 bp	+	567 bp	=	5.389 kb	-	730 bp = 4.659 kb
pEGFPC1	Gαi2C2AS	HindIII/EcoRV(SmaI)		4.731 kb	+	43 bp	+	415 bp	=	5.189 kb	-	730 bp = 4.459 kb
pEGFPC1	Gαi2C5S	HindIII/XhoI		4.731 kb	+	91 bp	+	415 bp	=	5.237 kb		
pEGFPC1	Gαi3C4AS	HindIII/EcoRV(SmaI)		4.731 kb	+	43 bp	+	588 bp	=	5.362 kb	-	730 bp = 4.632 kb
pEGFPC1	Gαi3C8S	HindIII/XhoI		4.731 kb	+	91 bp	+	588 bp	=	5.410 kb		
pEGFPC1	GαoC5AS	HindIII/EcoRV(SmaI)		4.731 kb	+	43 bp	+	585 bp	=	5.359 kb	-	730 bp = 4.629 kb
pEGFPC1	GαoC9S	HindIII/XhoI		4.731 kb	+	91 bp	+	585 bp	=	5.407 kb		

Tabelle 5.2.: Größenangaben in Kilobasen (kb) und Basenpaaren (bp) der Konstrukte nach Klonierung und nach Entfernung des EGFP-Gens
 Den Konstrukten wurde durch das Umklonieren über HindIII und EcoRV (SmaI) 43 Basenpaare und durch das Umklonieren über HindIII und XhoI 91 Basenpaare hinzugefügt. Zusammen mit der Vektorgröße des Eukaryonten-Expressionsvektors und dem Insert ergibt sich daraus die Gesamtgröße des Vektors. Die Entfernung des EGFP-Gens über die Restriktionsschnittstellen AgeI und BspEI verringerte die Größe der Konstrukte um 730 Basenpaare (das EGFP-Gen wurde mitsamt der Kozak-Sequenz und dem Startkodon aus dem Expressionsvektor entfernt, der Restvektor, der anschließend als pEGFPC1- (negativ da EGFP defizient) bezeichnet wurde, wurde über die kompatiblen Enden der Schnittstellen AgeI und BspEI religiert).

5.3.2. Größe der Fragmente bei Feststellung der Existenz und Orientierung in den Vektoren pCR2.1TOPO und pEGFPC1

Konstrukt	Existenz im Vektor	Orientierung im Vektor	Orientierung im Vektor
pCR2.1TOPOG α i1	EcoRI	BglIII/HindIII	PvuII/XbaI
V: 4.475 kb/I: 567 bp	3.892 kb/ 583 bp ^{*1}	2.897 kb/1.375 kb/ 203 bp ^{*2}	2.443 kb/694 bp/ 609 bp ^{*2} /361 bp/ 238 bp/130 bp
pCR2.1TOPOG α i2	EcoRI	BamHI	NsiI/XbaI
V: 4.323 kb/I: 415 bp	3.892 kb/ 431 bp ^{*1}	3.909 kb/ 414 bp ^{*2}	4.132 kb/ 191 bp ^{*2}
PCR2.1TOPOG α i3	EcoRI	BglIII/HindIII	PvuII/XbaI
V: 4.496 kb/I: 588 bp	3.892 kb/ 604 bp ^{*1}	2.921 kb/1.486 kb/ 89 bp ^{*2}	2.434 kb/694 bp/ 583 bp ^{*2} /361 bp/294 bp/130 bp
pCR2.1TOPOG α o	EcoRI	BamHI	PvuII/XbaI
V: 4.493 kb/I: 585 bp	3.892 kb/ 601 bp ^{*1}	4.051 kb/ 442 bp ^{*2}	2.488 kb/694 bp/ 503 bp ^{*2} /361 bp/317 bp/130 bp

Tabelle 5.3.: Enzymatische Restriktionsanalysen zur Feststellung der Existenz und der Orientierung der PCR-Fragmente im Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO

*1 Beweis der Existenz des PCR-Produktes im Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO

*2 Nachweis für die Orientierung im Subklonierungsvektor pCR2.1TOPO (G α i1: Sense, G α i2/G α i3 und G α o: Antisense)

V: Größe des gesamten Vektors bzw. Konstruktes, I: Größe des jeweiligen Inserts

EGFP negatives Konstrukt	Restriktionsanalyse	Konstrukt	Vektor	Insert
pEGFPC1-G α i1C5AS	Asel(Vspl)/MluI	4.659 kb	= 3.097 kb	+ 1.562 kb
	EcoRI	4.659 kb	= 4.074 kb	+ 585 bp
pEGFPC1-G α i2C2AS	Asel(Vspl)/MluI	4.459 kb	= 3.097 kb	+ 1.362 kb
	EcoRI	4.459 kb	= 4.026 kb	+ 433 bp
pEGFPC1-G α i3C4AS	Asel(Vspl)/MluI	4.632 kb	= 3.097 kb	+ 1.535 kb
	EcoRI	4.632 kb	= 4.026 kb	+ 606 bp
pEGFPC1-G α oC5AS	Asel(Vspl)/MluI	4.629 kb	= 3.097 kb	+ 1.532 kb
	EcoRI	4.629 kb	= 4.026 kb	+ 603 bp

Tabelle 5.4.: Enzymatische Restriktionsanalysen zum Nachweis der enzymatischen Entfernung des EGFP-Gens

Nach Entfernung des EGFP-Gens mit der Kozak-Sequenz und dem Startkodon wurde über die enzymatische Analyse mittels verschiedener Ansätze das erfolgreiche Herausschneiden der EGFP-Sequenz nachgewiesen: Mittels der Enzyme Asel (Vspl) und MluI wurde nachgewiesen, daß das EGFP-Gen aus den jeweiligen Konstrukten entfernt worden war, die enzymatische Analyse mit EcoRI diente dem Nachweis, daß die Antisense-Fragmente immer noch in den Konstrukten vorhanden war. Die Konstrukte sowie der Kontrollvektor wurden nach der Entfernung des EGFP-Gens als EGFP-negativ mit einem Negativzeichen hinter der Vektorbezeichnung versehen.

5.4. Literaturverzeichnis

1. LeRoith, D., and Zick, Y. (2001):
Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance.
Diabetes Care 24, 588-597
2. Häring, H. U. (1991):
The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance.
Diabetologia 34, 848-861
3. Gettys, T. W., Ramkumar, V., Surwit, R. S., and Taylor I. L. (1995):
Tissue-specific alterations in g protein expression in genetic versus diet-induced models of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the mouse.
Metabolism 44, 771-778
4. Polonsky, K. S. (1994):
The b-cell in diabetes : from molecular genetics to clinical research
Diabetes 44, 705-717
5. Turner, R. C., Hattersley, A. T., Shaw, J. T. E., and Levy, J. C. (1995):
Type II diabetes: clinical aspects of molecular biological studies.
Diabetes 44, 1-10
6. Rodgers, B. D., Bernier, M., and Levine, M.A. (2001) :
Endocrine regulation of G-protein subunit production in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *J. Endocrinol.* 168, 509-515
7. Livingstone, C., McLellan, A. R., McGregor, M. A., Wilson, A., Connell, J. M., Small, M., Milligan, G., Paterson, K. R., Houslay, M. D. (1991):
Altered G-protein expression and adenylate cyclase activity in platelets of non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) male subjects.
Biochem. Biophys. Acta 1096, 127-133
8. Shafrir, E., Ziv, E., and Mosthaf, L. (1999):
Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to β cell failure in animal models.
Ann. NY Acad. Sci. 18, 223-246
9. Bevan, P. (2001):
Insulin signaling.
J. Cell Sci. 114, 1429-1430
10. Ding, W. G., Renstrom, E., Rorsman, P., Buschard, K., Gromada, J. (1997):
Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca^{2+} -induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism.
Diabetes 46, 792-800
11. Lang, J. (1999):
Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion.
Eur. J. Biochem. 259, 3-17
12. Ullrich, S., and Wollheim, C. B. (1985):
Expression of both $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptors in an insulin-secreting cell line.
Mol. Pharmacol. 28, 100-106
13. Kampermann, J., Herbst, M., and Ullrich, S. (2000):
Effects of adrenaline and tolbutamide on insulin secretion in INS-1 cells under voltage control.
Cell. Physiol. Biochem. 10, 81-90

14. Hepler, J. R., and Gilman, A. G. (1992):
G proteins.
TIBS 17, 383-387
15. Sternweis, P. C., and Smrcka, A. V. (1992):
Regulation of phospholipase C by G proteins.
TIBS 17, 502-506
16. Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormich, F. (1990):
The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.
Nature 348, 125-132
17. Spiegel, A. M., Shenker, A., and Weinstein, L. S. (1992):
Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction.
Endocr. Rev. 13, 536-565
18. Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X.-N., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de Jong, P., Reed, R. R., Simon, M., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1992):
Evolution of the mammalian G protein α subunit multigene family.
Nat. Genet. 1, 85-91
19. Birnbaumer, L. (1990):
G proteins in signal transduction.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30, 675-705
20. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. M. (1990):
Receptor-effector coupling by G proteins.
Biochim. Biophys. Acta 1031, 163-224
21. Ferrara, C. M., and Cushman, S. W. (1999):
GLUT4 trafficking in insulin-stimulated rat adipose cells: evidence that heterotrimeric GTP-binding proteins regulate the fusion of docked GLUT4-containing vesicles.
Biochem. J. 343, 571-577
22. Knust, E. (2001):
G protein signaling and asymmetric cell division.
Cell 107, 125-128
23. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Yatani, A., Okabe, K., Mattera, R., Graf, R., Sanford, J., Codina, J., and Brown, A. M. (1990):
Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio. 25, 225-244
24. Rodbell, M. (1997):
The complex regulation of receptor-coupled G-proteins.
Adv. Enzyme Regul. 37, 427-35
25. Birnbaumer, L., and Birnbaumer, M. (1995):
Signal transduction by G proteins: 1994 Edition.
J. of Receptor & Signal Transduction Res. 15, 213-252
26. Birnbaumer, L. (1992):
Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for β/γ dimers as well as α subunits.
Cell 71, 1069-1072
27. Lohse, M. J. (1999):
G-proteins and their regulators.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 360, 3-4

28. Kleuss, C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G., and Wittig, B. (1992):
Different β -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors.
Nature 358, 424-426
29. Jeong, S.-W., and Ikeda S. R. (1999):
Sequestration of g-protein $\beta\gamma$ subunits by different g-protein α subunits blocks voltage-dependent modulation of Ca^{2+} channels in rat Sympathetic neurons.
J. Neurosci. 19, 4755-4761
30. DeWaard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V. E. S., Gurnett, C. A., and Campell, K.P. (1997):
Direct binding of G-protein β/γ complex to voltage-dependent calcium channels.
Nature 385, 446-450
31. Dascal, N. (2001):
Ion-channel regulation by G proteins.
Trends Endocrinol. Metab. 12, 391-398
32. Birnbaumer, L., Perez-Reyes, P., Bertrand, P., Gudermann, T., Wie, X.-Y., Kim, H., Castellano, A., and Codina, J. (1991):
Molecular diversity and function of G proteins and calcium channels.
J. Biol. Reprod. 44, 207-224
33. Offermanns, S. (1999):
New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-proteins through gene deletion studies.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 360, 5-13
34. Birnbaumer, L. (1991):
On the origins and the present state of the art of G protein research.
J. Receptor Res. 11, 577-585
35. Gromada, J., Hoy, M., Buschard, K., Salehi, A., and Rorsman, P. (2001).
Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic α -cells by $\text{Gi}2$ -dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules.
J. Physiol. 535, 519-532
36. Zigman, J. M., Westermarck, G. T., LaMendola, J., and Steiner, D. F. (1994):
Expression of cone transducin , $\text{G}\alpha$ and other G protein α -subunit messenger ribonucleic acids in pancreatic islets.
Endocrinol. 135, 31-37
37. Seaquist, E. R., Walseth, T. F., Redmon, J. B., and Robertson, R. P. (1994):
G-protein regulation of insulin secretion.
J. Lab. Clin. Med. 123, 338-345
38. Wilcox, M.D., Dingus, J., Balcueva, E.A., McIntire, W.E., Mehta, N.D., Schey, K.L., Robishaw, J.D., and Hildebrandt, J.D. (1995):
Bovine brain Go isoforms have distinct γ subunit compositions.
J. Biol. Chem. 270, 4189-4192
39. Skoglund, G., Basmaciogullari, A., Rouot, B., Marie, J.-C., and Rosselin, G. (1999):
Cell-specific localization of G protein α -subunits in the islets of Langerhans.
J. Endocrinol. 162, 31-37
40. Berrow, N. S., Milligan, G., and Morgan, N. G. (1992):
Immunological characterization of the guanine-nucleotide binding proteins Gi and Go in rat islets of Langerhans.
J. Mol. Endocrinol. 8, 103-118

41. Frayon, S., Pessah, M., Giroix, M.-H., Mercan, D., Boissard, C., Malaisse, W. J., Portah, B., and Garel, J.-M. (1999):
G α olf identification by RT-PCR in purified normal pancreatic B cells and in islets from rat models of non-insulin-dependent diabetes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 254, 269-272
42. Schmidt, A., Hescheler, J., Offermanns, S., Spicher, K., Hinsch, K.-D., Klinz, F.-J., Codina, J., Birnbaumer, L., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G., and Rosenthal, W. (1991):
Involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in the hormonal inhibition of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ currents in an insulin-secreting cell line (RINm5F).
J. Biol. Chem. 265, 18025-18033
43. Mazancourt, P., Goldsmith, P. K., and Weinstein, L. S. (1994):
Inhibition of adenylate cyclase activity by galanin in rat insulinoma cells is mediated by the G-protein Gi₃.
Biochem. J. 303, 369-375
44. Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., and Kaziro, Y. (1988):
Presence of three distinct molecular species of Gi protein α subunit.
J. Biol. Chem. 263, 6656-6664
45. Jones, D. T., Reed, R. R. (1987):
Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium.
J. Biol. Chem. 262, 14241-14249
46. Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M. R., Aunis, D., and Bader, M.-F. (1997):
Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells.
J. Biol. Chem. 272, 20564-20571
47. Sanchez-Margalet, V., Gonzalez-Yanes, C., Santos-Alvarez, J., and Najib, S. (1999):
Insulin acitvates G α _{i1,2} protein in rat hepatoma (HTC) cell membranes.
Cell Mol. Life Sci. 55, 142-147
48. Gillison, S. L., Sharp, G. W. G. (1994):
ADP ribosylation by cholera toxin identifies three G-proteins that are activated by the galanin receptor.
Diabetes 43, 24-32
49. Marie, J.-C., Rosselin, G., and Skoglund, G. (1996):
Pancreatic β -cell receptors and G proteins coupled to adenylyl cyclase.
Ann. NY Acad. Sci. 805, 122-312
50. Berrow, N. S., Hurst, R. D., Chan, S. L. F., and Morgan, N. G. (1992):
Immunoprecipitation of a pertussis toxin substrate of the Go family from rat islets of Langerhans.
Biosci. Rep. 12, 95-100
51. Komatsu, M., Schermerhorn, T., Aizawa, T., and Sharp, G. W. G. (1995):
Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca²⁺ and in the absence of any increase in intracellular Ca²⁺ in rat pancreatic islets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10728-10732
52. Wollheim, C. B., Lang, J., and Regazzi, R. (1996):
The exocytotic process of insulin secretion and ist regulation by Ca²⁺ and g-proteins.
Diabetes Rev. 4, 276-297
53. McClue, S. J., Selzer, E., Freissmuth, M., and Milligan, G. (1992):
Gi₃ does not contribute to the inhibition of adenylate cyclase when stimulation of an α 2-adrenergic receptor causes activation of both Gi₂ and Gi₃.
Biochem. J. 284, 565-568

54. Malaisse, W. J., and Malaisse-Lagae, F. (1984):
The role of cyclic AMP in insulin release.
Experientia 40, 1068-1075
55. Abel, K.-B., Lehr, S., and Ullrich, S. (1996):
Adrenaline, not somatostatin-induced hyperpolarization is accompanied by a sustained inhibition of insulin secretion in INS-1 cells. Activation of sulfonylurea K⁺_{ATP} channels is not involved.
Pflugers Arch. 432, 89-96
56. Deeney, J. T., Prentki, M., and Corkey, B. E. (2000):
Metabolic control of β -cell function.
Sem. Cell & Develop. Biol. 11, 267-275
57. Trapp, S., Tucker, S. J., and Ashcroft, F. M. (1997):
Activation and inhibition of K-ATP currents by guanine nucleotides is mediated by different channel subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 8872-8877
58. Ashcroft, S. J. H., and Ashcroft, F. M. (1990):
Properties and functions of ATP-sensitive K⁺-channels.
Cell. Signal. 2, 197-214
59. Cook, D. L., and Hales, C. N. (1984):
Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cells.
Nature 311, 271-3
60. Smith, P. A., Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1990):
Simultaneous recordings of Glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K⁺-currents in isolated mouse pancreatic β -cells.
FEBS Lett. 261, 187-190
61. Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1990):
ATP-sensitive K⁺ channels: a link between β cell metabolism and insulin secretion.
Biochem. Soc. Trans. 18, 109-111
62. Cook, D. L., Satin, L. S., Ashford, M. L. J., and Hales, C. N. (1988):
ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells.
Diabetes 37, 495-498
63. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement IV, J. P., Boyd III, A. E., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. (1995):
Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion.
Science 268, 423-429
64. Ullrich, S., Abel, K.-B., Lehr, S., and Greger, R. (1996):
Effects of glucose, forskolin, and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin secreting cell line INS-1.
Pflugers Arch. 432, 630-636
65. Vajna, R., Klöckner, U., Pereverzev, A., Weiergräber, M., Chen, X.-H., Miljanisch, G., Klugbauer, N., Hescheler, J., Perez-Reyes, E., Schneider, T. (2001):
Functional coupling between 'R-type' Ca²⁺ channels and insulin secretion in insulinoma cell line INS-1.
Eur. J. Biochem. 268, 1066-75
66. Bokvist, K., Eliasson, L., Ämmälä, C., Renström, E., and Rorsman, P. (1995):
Co-localization of L-type Ca²⁺-channels and insulin-containing secretory granules and its significance of the initiation of exocytosis in mouse pancreatic β cells.
EMBO 14, 50-57

67. Henquin, J. C., and Meissner, H. P. (1984):
Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells.
Experientia 40, 1043-1052
68. Prentki, M., and Matschinsky, F. M. (1987):
 Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67, 1185-1248
69. Hellman, B., Gylfe, E., Bergsten, P., Grapengiesser, E., Lund, P. E., Berts, A., Tengholm, A., Pipeleers, D. G., and Ling, Z. (1994):
Glucose induces oscillatory Ca^{2+} signalling and insulin release in human pancreatic β cells. *Diabetologia* 37 (Suppl 2), S11-20
70. Howell, S. L., Jones, P. M., and Persaud, S. J. (1990):
Protein kinase C and the regulation of insulin secretion.
Biochem Soc Trans 18, 114-116
71. Valverde, I., Malaisse, W. J. (1984):
Calmodulin and pancreatic β cell function.
Experientia 40, 1061-1068
72. Malaisse, W. J. (1984):
Stimulus-secretion coupling in the pancreatic β cell: concluding remarks.
Experientia 40, 1134-1135
73. Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ämmälä, C., Bokvist, K., and Rorsman, P. (1994):
Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells.
J. Cell. Biochem. 55, 54-65
74. Zawalich, W. S., and Zawalich, K. C. (1996):
Regulation of insulin secretion by phospholipase C.
Am. Physiol. Soc. 271, E409-E416
75. Petersen, O. H., and Wollheim, C. B. (1990):
Diacylglycerol as messenger.
Nature 344, 300
76. Howell, S. L., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (1994):
Regulation of insulin secretion: the role of second messengers.
Diabetologia 37 (Suppl 2), S30-S35
77. Ämmälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Berggren, P.-O., Honkanen, R. E., Sjöholm, A., and Rorsman, P. (1994):
Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic β cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4343-4347
78. Landt, M., Easom, R. A., Colca, L. R., Wolf, B. A., Turk, J., Mills, L. A., and McDaniel, M. L. (1992):
Parallel effects of arachidonic acid on insulin secretion, calmodulin-dependent protein kinase activity and protein kinase C activity in pancreatic islets.
Cell Calcium 13, 163-172
79. Bajjalieh, S. (2001):
SNAREs take the stage: a prime time to trigger neurotransmitter secretion.
Trends Neurosci. 24, 678-680
80. Sihra, T. S., Nairn, A. C., Kloppenburg, P., Lin, X., and Pouzat, C. (1995) :
A role for calcineurin (protein phosphatase-2B) in the regulation of glutamate release.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 212, 609-616

81. Nichols, R. A., Suplick, G. R., and Brown, J. M. (1994):
Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate.
J. Biol. Chem. 269, 23817-23823
82. Rusnak, F., and Mertz, P. (2000):
Calcineurin: form and function.
Physiol. Rev. 80, 1483-1521
83. Murphy, L. I., and Jones, P. M. (1996):
Phospho-serine/threonine phosphatases in rat islets of Langerhans: identification and effect on insulin secretion.
Mol. Cell. Endocrinol. 117, 195-202
84. Cohen, P. (1989):
The structure and regulation of protein phosphatases.
Annu. Rev. Biochem. 58, 453-508
85. Groblewski, G. E., Wagner, A. C. C., and Williams, J. A. (1994):
Cyclosporin A inhibits Ca²⁺/Calmodulin dependent protein phosphatase and secretion in pancreatic acinar cells.
J. Biol. Chem. 269, 15111-15117
86. Klee, C. B., Crouch, T. H., and Krinks, M. H. (1979):
Calcineurin: A calcium and calmodulin-binding protein of the nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6270-6273
87. Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983):
The protein phosphatases involved in cellular regulation.
Eur. J. Biochem. 132, 255-261
88. Awumey, E. M., Moonga, B. S., Sodam, B. R., Koval, A. P., Adebajo, O. A., Kumegawa, M., Zaidi, M., and Epstein, S. (1999):
Molecular and functional evidence for calcineurin-A α and β isoforms in the osteoclast: Novel insights into cyclosporin A action on bone resorption.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 254, 248-252
89. Tumlin, J. A. (1997):
Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport.
Am. J. Kidney Dis. 30, 884-895
90. Tumlin, J. A., Someren, J. T., Swanson, C. E., and Lea, J. P. (1995):
Expression of calcineurin activity and α subunit isoforms in specific segments of the rat nephron. *Am. J. Physiol.* 269, F558-563
91. Buttini, M., Limonta, S., Luyten, M., and Boddeke, H. (1995):
Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney.
Histochem. J. 27, 291-299
92. Alexander, D. R., Hexham, J. M., and Crumpton, M. J. (1988):
The association of type1, type 2A and type 2B phosphatases with the human T lymphocyte plasma membrane.
Biochem. J. 256, 885-892
93. Chantler, P. D. (1985):
Calcium-dependent association of a protein complex with the lymphocyte plasma membrane: probable identity with calmodulin-calcineurin.
J. Cell Biol. 101, 207-216
94. Pallen, C. J., and Wang, J. H. (1985):
A multifunctional calmodulin-stimulated phosphatase.
Arch. Biochem. Biophys. 237, 281-291

95. Gagliardino, J. J., Krinks, M. H., and Gagliardino, E. E. (1991): Identification of the calmodulin-regulated protein phosphatase, calcineurin, in rat pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 370-373
96. Bosser, R., Aligue, R., Guerini, D., Agell, N., Carafoli, E., and Bachs, O. (1993): Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei. *J. Biol. Chem.* 268, 15477-15483
97. Pujol, M. J., Bosser, R., Vendrell, M., Serratosa, J., and Baehs, O. (1993): Nuclear calmodulin-binding proteins in rat neurons. *J. Neurochem.* 60, 1422-1428
98. Shibasaki, F., and McKeon, F. (1995): Calcineurin function in Ca²⁺-activated cell death in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 131, 735-743
99. Usuda, N., Arai, H., Sasaki, H., Hanai, T., Nagata, T., Muramatsu, T. Kincaid, R. L., and Higuchi, S. (1996): Different subcellular localization of neural isoforms of the catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin) in central nervous system neurons: immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin sections employing antigen retrieval by microwave irradiation. *Euro. J. Cytochem.* 44, 13-18
100. Garver, T. D., Kincaid, R. L., Conn, R. A., and Billingsley, M. L. (1999): Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligonucleotides leads to persistent phosphorylation of Tau protein at Thr 181 and Thr 321. *Mol. Pharmacol.* 55, 632-641
101. Montoro, R. J., Diaz-Dido, J., Avila, J., and Lopez-Barneo, J. (1993): N-methyl-D-aspartate stimulates the dephosphorylation of the microtubule-associated protein 2 and potentiates excitatory synaptic pathways in the rat hippocampus. *Neuroscience* 54, 859-871
102. Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y., and Miyamoto, E. (1985): Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, Tau factor, and tubulin by calcineurin. *J. Neurochem.* 45, 276-283
103. Redecker, P., and Cetin, Y. (1997): Rodent pancreatic islet cells contain the calcium-binding proteins calcineurin and calretinin. *Histochem. Cell Biol.* 108, 133-139
104. Groblewski, G. E., Yoshida, M., Bragado, M. J., Ernst, S. A., Leykam, J., and Williams, J. A. (1998): Purification and characterization of a novel physiological substrate for calcineurin in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273, 22738-22744
105. Davare, M. A., Horne, M. C., and Hell, J. W. (2000): Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 39710-39717
106. Klee, C. B., Ren, H., and Wang, X. (1998): Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273, 13367-13370
107. Yakel, J. L. (1997): Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *TIPS* 18, 124-134

108. Tumlin, J. A., Lea, J. P., Swanson, C. E., Smith, C. L., Edge, S. S., and Someren, J. S. (1997): Aldosterone and dexamethasone stimulate calcineurin activity through a transcription-independent mechanism involving steroid receptor-associated heat shock proteins. *J. Clin. Invest.* 99, 1217-1223
109. Ebihara, K., Fukunaga, K., Matsumoto, K., Shichiri, M., and Miyamoto, E. (1996). Cyclosporin A stimulation of glucose-induced insulin secretion in Min6 cells. *Endocrinol.* 137, 5255-5263
110. Lester, L. B., Faux, M. C., Nauvert, J. B., and Scott, J. D. (2001): Targeted protein kinase A and PP-2B regulate insulin secretion through reversible phosphorylation. *Endocrinol.* 142, 1218-1227
111. Renström, E., Ding, W.-G., Bokvist, K., and Rorsman, P. (1996): Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting β cells by activation of calcineurin. *Neuron* 17, 513-522
112. Hay, J. C. (2001): SNARE complex structure and function. *Exp. Cell Res.* 271, 10-21
113. Easom, R. A. (2000): β -granule transport and exocytosis. *Sem. Cell Dev. Biol.* 11, 253-266
114. Südhof, T. C. (2000): The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320
115. Jahn, R., and Südhof, T. C. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68, 863-911
116. Foster, L. J., and Klip A. (2000): Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C877-C890
117. Cheatham, B. (2000): GLUT4 and company: SNAREing roles in insulin-regulated glucose uptake. *TEM* 11, 356-361
118. Park, J. B., Farnsworth, C. C., and Glomset, J. A. (1997): Ca^{2+} /Calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 272, 20857-20865
119. Sharp, G. W. G. (1996): Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am. Physiol. Soc.* 271, 1781-99
120. Praz, G. A., Halban, P. A., Wollheim, C. B., Blondel, B., Strauss, A. J., and Renold, A. E. (1983) : Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochem. J.* 210, 345-352
121. Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J.-I., and Oka, Y. (1993): Pancreatic β cell line Min6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36, 1139-1145

122. Deeney, J. T., Köhler, M., Kubik, K., Brown, G., Schultz, V., Tornheim, K., Corkey, B. E., and Berggren, P.-O. (2001):
Glucose-induced metabolic oscillations parallel those of Ca²⁺ and insulin release in clonal insulin-secreting cells.
J. Biol. Chem. 276, No. 40, 33946-36950
123. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992):
Establishment of 2-Mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines.
Endocrinology 130, 167-178
124. Pietruck, F., Spleiter, S., Daul, A., Philipp, T., Derwahl, M., Schatz, H., and Siffert, W. (1998):
Enhanced G protein activation in IDDM patients with diabetic neuropathy.
Diabetologia 41, 94-100
125. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982):
Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.
EMBO J. 1, 841-5
126. Sukharev, S. I., Klenchin, V. A., Serov, S. M., Chernomordik, L. V., and Chizmadzhev, Y. A. (1992) :
Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores.
Biophys. J. 63, 1320-7
127. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989):
Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, USA
128. Regazzi, R., Ullrich, S., Kahn, R. A., and Wollheim, C. B. (1991):
Redistribution of ADP-ribosylation factor during stimulation of permeabilized cells with GTP analogues. *Biochem. J.* 275, 639-644
129. Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H.-G., and Mesecke, S. (1979):
A simple, versatile and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences.
Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 360, 1657-1670
130. Laemmli, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
131. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979):
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354
132. Weiss, B., Davidkova, G., and Zhou, L.-W. (1999):
Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes.
Cell Mol. Life Sci. 55, 334-358
133. Dove, A. (2002):
Antisense and sensibility.
Nat. Biotechnol. 20, 121-124
134. Kashihara, N., Maeshima, Y., and Makino, H. (1998):
Antisense oligonucleotides.
Exp. Nephrol. 6, 84-88
135. Wagner, R. W. (1994):
Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides.
Nature 372, 333-335

136. Malcolm, A. D. B. (1992):
Uses of antisense nucleic acids - an introduction.
Biochem. Soc. Trans. 20, 745-746
137. Takayama, K. M., and Inouye, M. (1990) :
Antisense RNA.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25 155-184
138. Helene, C. , and Toulme, J.-J. (1990):
Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta. 1049, 99-125
139. Neckers, L. and Whitesell, L. (1993):
Antisense technology: biological utility and practical considerations.
Am. J. Physiol. 265, 1-12
140. Case, C. C., and Dhundale, A. R. (1991):
Gene regulation by antisense RNA and DNA.
Antisense Res. Dev. 1, 207-217
141. Pilowsky, P. M., Suzuki, S., and Minson, J. B. (1994):
Antisense oligonucleotides: a new tool in neuroscience.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 21, 935-944
142. Marcus-Sekura, C. J. (1988):
Techniques for using antisense oligodeoxyribonucleotides to study gene expression.
Anal. Biochem. 172, 289-295
143. Jen, K.-Y., and Gewirtz, A. M. (2000):
Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options
and current strategies.
Stem Cells 18, 307-319
144. Crooke, R. M. (1991):
In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides.
Anticancer Drug. Des. 6, 609-646
145. Weintraub, H. M. (1990) :
Antisense RNA and DNA.
Sci. Am. 262, 40-46
146. Walder, J. (1988):
Antisense DNA and RNA: progress and prospects.
Genes Dev. 2, 502-504
147. Phillips, M. I., and Gyurko, R. (1997):
Antisense oligonucleotides: new tools for physiology.
News Physiol. Sci. 12, 99-105
148. Crooke, S. T. (1998):
Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H.
Antisense & Nucleic Acid Drug Develop. 8, 133-134
149. Izant, J. G. (1989):
Antisense "Pseudogenetics".
Cell Motil. Cytoskeleton 14, 81-91
150. Gibson, I. (Ed.) (1997).
Antisense and ribozyme methology.
Chapman & Hall, Weinheim

151. Mohuczy, D., Tang, X., and Phillips, M. I. (2000):
Delivery of antisense DNA by vectors for prolonged effects in vitro and in vivo.
Meth. Enzymol. 314, 32-51
152. Weiss, B., Davidkova, G., and Zhang, S.-P. (1997) :
Antisense strategies in neurobiology.
Neurochem. Int. 31, 321-348
153. Jacobi, R., Moertl, E., and Koepfel, M. A. (2001):
Vectors for the generation of FLAG- or EGFP-tagged cDNA constructs and the EGFP-tagged
antisense RNA-constructs.
Biotechniques 30, 476-478
154. Izant, J. G., Hoff, A. M., Sardelli, A. D., and Ford, M. (1991):
Chimeric antisense RNAs.
Antisense Res. Dev. 1, 371
155. Rösler, M., Ilgner, C., Hescheler J., and Ullrich, S. (1999):
Molecular characterisation of adrenergic signal transduction pathways in insulin secreting cells.
Pflugers Arch. 437, R106

5.5. Nomenklatur der Bakterien- und INS-1 Zellklone

Bakterienklone

pCR2.1TOPO (Vektor)	zur Subklonierung von PCR-Produkten mit dA-Überhang
pCR2.1TOPO G α i1S	G α i1-PCR-Produkt, in Sense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site
pCR2.1TOPO G α i2AS	G α i2-PCR-Produkt, in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site
pCR2.1TOPO G α i3AS	G α i3-PCR-Produkt, in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site
pCR2.1TOPO G α oAS	G α o-PCR-Produkt, in Antisense-Orientierung zur M13 Reverse Priming Site
pEGFPC1 (Vektor)	Enhanced Green Fluorescent Protein enthaltender Vektor
pEGFPC1G α i1C2S	pEGFPC1-Vektor mit G α i1-Fragment in Sense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C2
pEGFPC1G α i1C5AS	pEGFPC1-Vektor mit G α i1-Fragment in Antisense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C5
pEGFPC1G α i2C2AS	pEGFPC1-Vektor mit G α i2-Fragment in Antisense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C2
pEGFPC1G α i2C5S	pEGFPC1-Vektor mit G α i2-Fragment in Sense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C5
pEGFPC1G α i3C4AS	pEGFPC1-Vektor mit G α i3-Fragment in Antisense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C4
pEGFPC1G α i3C8S	pEGFPC1-Vektor mit G α i3-Fragment in Sense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C8
pEGFPC1G α oC5AS	pEGFPC1-Vektor mit G α o-Fragment in Antisense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C5
pEGFPC1G α oC9S	pEGFPC1-Vektor mit G α o-Fragment in Sense-Orientierung zum CMV-Promoter, Klon C9
pEGFPC1-	EGFG negativer Vektor, das EGFP-Gen wurde mit Kozak-Sequenz und Start-Kodon herausgeschnitten
pEGFPC1-G α i1C5AS	EGFG negativer, gegen G α i1 gerichteter Antisense-Klon C5
pEGFPC1-G α i2C2AS	EGFG negativer, gegen G α i2 gerichteter Antisense-Klon C2
PEGFPC1-G α i3C4AS	EGFG negativer, gegen G α i3 gerichteter Antisense-Klon C4
PEGFPC1-G α oC5AS	EGFG negativer, gegen G α o gerichteter Antisense-Klon C5

Tabelle: Liste der Bakterienklone

Für die Durchführung der Antisense-Experimente wurden die Vektoren pCR2.1TOPO (Invitrogen, Heidelberg) zur Subklonierung der PCR-Produkte und der Eukaryonten-Expressionsvektor pEGFPC1 (Clontech,) zur Klonierung der PCR-Produkte in Sense- und Antisense-Orientierung downstream des EGFP-Gens ausgewählt. Die Bezeichnung des jeweiligen Vektors steht den verschiedenen Konstrukten voran z.B. **pCR2.1TOPOG α i1S** oder **pEGFPC1G α i1C2S**. Nach der Vektorbezeichnung folgt die Angabe des Inserts z.B. bei pCR2.1TOPO**G α i1** das PCR-Produkt G α i1. Der Insertbezeichnung hinten angestellt befindet sich die Angabe über die Klonnummer des selektionierten Bakterienklons z.B. pEGFPC1G α i1**C2S**. Hinter der Angabe der Klonnummer befindet sich die Angabe über die Orientierung, S für die Sense und AS für die Antisense-Orientierung, des Inserts im Vektor, z.B. pCR2.1TOPOG α i1**S**, dabei bezieht sich die Orientierung im pCR2.1TOPO-Vektor auf die Orientierung zur M13 Reverse Priming Site und die Orientierung im pEGFPC1-Vektor zum CMV-Promotor (CMV: Cytomegalovirus). Konstrukte, bei denen das EGFP-Gen enzymatisch entfernt wurde, sind EGFP defizient oder negativ und tragen nach der Angabe des Vektornamens pEGFPC1 ein Minuszeichen zur Anzeige des Fehlens des EGFP-Gens.

Stabil transfizierte INS-1 Einzelzellklone

pEGFPC1- C17	stabil transfizierter EGFP negativer INS-1 Einzelzellklon C17
pEGFPC1-G α i3C4ASC3	stabil transfizierter, EGFP negativer INS-1 Einzelzellklon, Zellen enthalten gegen G α i3 gerichtetes, stabil expremiertes AS-Fragment, Klon C3
pEGFPC1-G α i3C4ASC7	stabil transfizierter, EGFP negativer INS-1 Einzelzellklon, Zellen enthalten gegen G α i3 gerichtetes, stabil expremiertes AS-Fragment, Klon C7
pEGFPC1-G α oC5ASC17	stabil transfizierter, EGFP negativer INS-1 Einzelzellklon, Zellen enthalten gegen G α o gerichtetes, stabil expremiertes AS-Fragment, Klon C17

Tabelle: Liste stabil transfizierter INS-1 Einzelzellklone

Bei den stabil transfizierten INS-1 Zellen folgt der Nomenklatur des jeweiligen AS-Konstruktes die Angabe des INS-1 Einzelzellklons wie z.B bei pEGFPC1-G α i3C4ASC7 (C7 ist die Bezeichnung des stabil transfizierten INS-1 Einzelzellklons bei dem das Antisense-Konstrukt stabil expremiert wird).

5.6. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges betreut worden.

Köln, den 02.05.02

Ort, Datum

 Martin Rösler

5.7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau PD Dr. Susanne Ullrich für die Bereitstellung des Themas sowie für die ständige Kontrolle der Arbeit und Anwesenheit im Labor bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Hescheler danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, sowie für die ständigen, anregenden und kompetenten Diskussionen im Verlauf der Promotion.

Ich danke der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Finanzierung des Projektes „Effekte von Adrenalin und Somatostatin auf die Insulinsekretion in INS-1 Zellen“, über das die Bezahlung meiner Doktorarbeit gewährleistet wurde.

Größten Dank möchte ich meinen Betreuern in den Naturwissenschaftlichen Instituten, Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges (Leiter des Institutes für Zoologie, Weyertal, Köln) und Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching (Institut für Genetik, Zülpicher Str., Köln), die mir bei der Beendigung der Doktorarbeit jederzeit mit kompetentem und freundlichem Rat zur Seite standen, gegenüber aussprechen. Ohne Ihre Hilfe und Unterstützung wäre diese Doktorarbeit möglicherweise nie zu einem Abschluß gekommen.

Im Physiologischen Institut gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Toni Schneider, bei dem ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Vorbereitung des Seminars im Institut für Zoologie, sowie für die ständige konstruktive Kritik und Anregungen beim Zusammenschreiben und dem Abschluß der Promotion bedanke.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Christina Kaiser, Frau Carmen Ilgner, Frau Andrea Hufschmidt und Herrn Dr. Ji-Ping Su bedanken, die durch Ihre Unterstützung und Zusammenarbeit zu einer netten Arbeitsatmosphäre im Labor beigetragen haben. Frau Carmen Ilgner möchte ich für die Durchführung der Radioimmunoassays, für die Hilfe in der Zellkultur und die Durchführung der RNA-Isolationen danken.

Ferner möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Toni Schneider bedanken, Herrn Rolf Vajna, Frau Conny Gissel, Frau Margit Henry, Frau Susanne Schulze und Frau Renate Clemens für die anregenden Diskussionen, netten Unterhaltungen sowie einfach für den netten Umgangston.

Abschließend möchte ich mich noch bei Frau Dr. Nibedita Lenka, Frau Kerstin Fischer sowie bei Herrn Michael Bickel bedanken.

Letztendlich gilt mein Dank ebenso den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der Vegetativen Physiologie, die durch Ihren freundlichen Umgangston stets zu einer netten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

5.8. Lebenslauf

Martin Rösler
Luxemburger Str. 268
50937 Köln
Tel.: 0221/415889

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	21.11.1965	
Geburtsort		Frankfurt am Main
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch

SCHULBILDUNG

Grundschule	08/71–07/75	Hinseler-Gemeinschafts-Grundschule in Essen
Gymnasium	08/75	Gymnasium Überryhr Essen
	06/86	Erlangung des Abiturs

BUNDESWEHR	07/86–09/87	Wehrdienst beim 1. Fernmeldebataillon 840 in der Kaserne Essen-Kray
-------------------	-------------	---

STUDIUM	WS88/89	Studium LA Biologie/Anglistik an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
	SS89	Studium an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster (Umstieg von LA auf Diplomstudiengang)
	WS89/90	Rückkehr an die Carl von Ossietzky Universität Oldenburg – Studium als Diplombiologe
	SS91	Vordiplom in Biologie, Note: befriedigend

DIPLOMARBEIT	06/95–06/96	Diplomarbeit „Auswirkungen von Oxidativem Streß auf Proteine in Astrozytenprimärkulturen“
---------------------	-------------	---

DIPLOM	SS07/96	Abschluß des Studiums Diplom Note: gut
---------------	---------	---

	08/96–07/97	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut II der Albert-Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau (Arbeit an Interaktion zwischen CFTR und dem epithelialen Natriumkanal α rENac)
--	-------------	--

PROMOTION	08/97–07/00	Durchführung der Experimentalarbeiten im Rahmen der Promotion „Charakterisierung und Rolle Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine in Insulin-sezernierenden Zellen“ am Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln mit dem Ziel einer naturwissenschaftlichen Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln (Betreuer: Prof. Dr. Ansgar Bueschges, Institut für Zoologie, Weyertal 119, 50117 Köln)
	05/2002	Einreichung der Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
	11/2002	Mündliche Disputation

Martin Rösler

Köln, den 07.03.2003

Berichterstatter : Prof. Dr. Ansgar Bueschges
Prof. Dr. Sigrun Korsching

Tag der mündlichen Prüfung : 11.11.2002 11.⁰⁰