

Aus der Klinik für Innere Medizin
Abt. Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle Untersuchung des Pigment epithelium derived
factor (PEDF) in β -Zellen des endokrinen Pankreas**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

André Kutz

aus Ludwigsfelde

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Spranger
2. Prof. Dr. med. H. Krude
3. Prof. Dr. med. J. Jordan

Datum der Promotion: 18.09.2009

Meiner Familie

A. Inhaltsverzeichnis

A. Inhaltsverzeichnis	I
B. Abbildungsverzeichnis	IV
C. Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Klassifikation	1
1.1.2 Komplikationen	2
1.2 Steuerung der β-Zell-Funktion	3
1.2.1 Insulinsekretion	3
1.2.2 Insulinexpression	4
1.3 Pigment epithelium derived factor (PEDF)	6
1.4 Fragestellung der Arbeit	7
2. Materialien	8
2.1 Chemikalien/Biochemikalien	8
2.2 Verbrauchsmaterial	11
2.3 Geräte	11
3. Methoden	13
3.1 Zellkultur	13
3.1.1 In vitro-Kultur	13
3.1.1.1 INS-1 Zellen	13
3.1.1.2 HEK-293 Zellen	13
3.1.2 Herstellung von gestripptem Serum	13
3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometers	14
3.1.4 MTS-Assay	14
3.1.5 Herstellung von rekombinantem PEDF nach Transfektion	15
3.1.5.1 Transfektion	15
3.1.5.2 Aufreinigung	16
3.1.5.3 Anreicherung des rekombinanten Proteins	17
3.1.5.4 Coomassie-Blue-Färbung	17

3.1.5.5 Proteinbestimmung nach Stoschek	18
3.1.6 Durchführung der In vitro-Studien	19
3.1.6.1 zytotoxisch und oxidativ induzierte Apoptose	19
3.1.6.2 Proliferation	19
3.1.6.3 Expression von Insulin und weiterer β -Zell-Gene	20
3.1.6.4 Insulinsekretion	20
3.2 Molekularbiologische Methoden	21
3.2.1 RNA-Extraktion	21
3.2.2 DNase-Verdauung	22
3.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration	22
3.2.4 cDNA-Synthese	22
3.2.5 DNA-Amplifikation	23
3.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
3.2.5.2 Semiquantitative PCR	24
3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren	27
3.2.7 Isolierung und Aufreinigung des cDNA-Fragmentes aus der Agarose-Gelmatrix und Präparation der Sequenzierreaktion	28
3.2.8 Sequenzierreaktion	29
3.3 Proteinbiochemische Methoden	29
3.3.1 Proteinextraktion	29
3.3.2 SDS-PAGE	30
3.3.3 Semitrockener Proteintransfer	32
3.3.4 Immunblot	33
3.3.5 Insulin-ELISA	34
3.4. Statistische Methoden	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Nachweis von PEDF in INS-1 Zellen	36
4.1.1 Expression von PEDF mRNA in INS-1 Zellen	36
4.1.2 Nachweis von PEDF auf Proteinebene	37
4.2 In vitro-Studien	38
4.2.1 zytotoxischer und oxidativer Stress in INS-1 Zellen sowie deren Beeinflussung durch PEDF	38

4.2.2 Einfluss von Glucose und PEDF auf die Proliferation der INS-1 Zellen	41
4.2.3 Insulinexpression in INS-1 Zellen	45
4.2.3.1 Einfluss von Glucose auf die mRNA-Expression von Insulin	45
4.2.3.2 Einfluss von PEDF auf die mRNA-Expression von Insulin	46
4.2.4 Beeinflussung der Insulinsekretion durch Glucose und PEDF	48
4.2.5 Bestimmung der Expression weiterer β -Zell-Gene	50
4.2.5.1 Etablierung der RT-PCR	50
4.2.5.2 Einfluss von Glucose und PEDF auf die Expression verschiedener β -Zell-Gene	51
5. Diskussion	55
5.1 Nachweis von PEDF in INS-1 Zellen	55
5.2 Proliferation	56
5.3 β-Zell-Funktion	59
5.3.1 Expression von Insulin und weiterer β -Zell-Gene	59
5.3.2 Insulinsekretion	63
5.3.3 Differenzierung	64
6. Zusammenfassung	66
7. Literaturverzeichnis	67
8. Anhang	
8.1 Danksagung	85
8.2 Lebenslauf	86
8.3 Selbständigkeitserklärung	87

B. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der Glukose-induzierten Insulinsekretion der β -Zelle des Pankreas	4
Abb. 1.2	Modell des regulatorischen Netzwerkes der Transkriptionsfaktoren	5
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des pCEP4-PEDF Plasmids	16
Abb. 3.2	Aufbau des semitrockenen Proteintransfers	33
Abb. 3.3	Schematische Darstellung des Insulin-ELISA	34
Abb. 4.1	Darstellung des aus 144 Basenpaaren bestehenden PEDF-cDNA-Fragmentes nach Auftrennung in einer 1%igen Agarose-Gelmatrix	36
Abb. 4.2	Ausschnitt aus der Sequenz der analysierten PEDF-mRNA	37
Abb. 4.3	Detektion von PEDF im Western blot	37
Abb. 4.4	Inhibition der metabolischen Aktivität durch proinflammatorische Zytokine und deren Beeinflussung durch PEDF in INS-1 Zellen	38
Abb. 4.5	Konzentrationsreihe der proinflammatorischen Zytokine und der Einfluss von PEDF in INS-1 Zellen	39
Abb. 4.6	Konzentrationsreihe zur Bestimmung des Einflusses von PEDF auf die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine in INS-1 Zellen	40
Abb. 4.7	Inhibition der metabolischen Aktivität durch oxidativen Stress und deren Beeinflussung durch PEDF in INS-1 Zellen	41
Abb. 4.8	Wirkung von Glucose auf die Proliferation der INS-1 Zellen	42
Abb. 4.9	Wirkung von PEDF auf die Proliferation der INS-1 Zellen (I)	43
Abb. 4.10	Wirkung von PEDF auf die Proliferation der INS-1 Zellen (II)	44

Abb. 4.11	Wirkung chronischer Hyperglykämie auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen	45
Abb. 4.12	Wirkung von PEDF auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen	46
Abb. 4.13	Chronische Wirkung von PEDF auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen	47
Abb. 4.14	Wirkung von kommerziell erworbenem PEDF auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen	48
Abb. 4.15	Wirkung von PEDF auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen	59
Abb. 4.16a	Darstellung der Standardkurven des amplifizierten Glukokinase-Fragmentes im konzentrierten und einem 5fach verdünnten Ansatz in der RT-PCR	50
Abb. 4.16b	Darstellung des spezifischen Schmelzpunktes des amplifizierten Glukokinase-Fragmentes	50
Abb. 4.16c	Darstellung des aus 301 Basenpaaren bestehenden Glukokinase-Fragmentes nach RT-PCR und anschließender Auftrennung in einer 1%igen Agarose-Gelmatrix	51
Abb. 4.17	Wirkung von PEDF auf die Expression von PDX-1 in INS-1 Zellen	52
Abb. 4.18	Wirkung von PEDF auf die Expression von Nkx6.1 (a) und HNF4 α (b) in INS-1 Zellen	53
Abb. 4.19	Wirkung von PEDF auf die Expression von Glukokinase (a), GLUT2 (b) und IAPP (c) in INS-1 Zellen	54

C. Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BETA2	β-Zell E-Box Transaktivator 2
bHLH	basic helix loop helix
BSA	bovine serum albumin
bZIP	basic leucine zipper
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaM-Kinase	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cDNA	complementary DNA
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	2'Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPC-1	early population doubling level cDNA-1
et al.	et aliis (lat.): und andere
FCS	fetal calf serum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

GK	Glukokinase
Glc	Glukose
GLP-1	glucagon like peptide-1
GLUT2	Glukosetransporter 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]
HNF	hepatocyte nuclear factor
IAPP	islet amyloid polypeptide
IFN- γ	Interferon-gamma
IDX-1	islet duodenum homeobox-1
IL-1 β	Interleukin 1 beta
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
IPF-1	insulin promoter factor-1
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kDa	Kilodalton
MAPK	mitogen activated protein kinase
min	Minute
MODY	maturity onset diabetes of the young
MnSOD	Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger RNA
MTS	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogen
NeuroD1	neurogenic differentiation 1
NF κ B	nuclear factor kappa B
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAX-4	paired box-4
PBS	phosphor buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDX-1	pancreatic-duodenal homeobox-1
PEDF	pigment epithelium derived factor
PI-3`-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPE3b1	rat insulin promoter element 3b1
RNA	ribonucleic acid
RPE	retinal pigment epithelium
RT	reverse transcription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STF-1	somatostatin transcription factor-1
TBS/T	Tris Base/Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	Wortmannin
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Klassifikation

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung. Es werden verschiedene Formen unterschiedlicher Ätiologie unterschieden, die als Gemeinsamkeit den relativen oder absoluten Insulinmangel aufweisen. Das gemeinsame Leitsymptom unbehandelter Patienten ist die chronische Hyperglykämie.

Diabetes mellitus tritt vor allem in den 2 Hauptformen Typ 1 und Typ 2 auf. Andere Formen sind der Gestationsdiabetes, der sich erstmals in der Schwangerschaft entwickelt, oder ein durch einzelne genetische Defekte verursachter Diabetes (MODY). Auch in Zusammenhang mit Endokrinopathien und Infektionen kann ein Diabetes mellitus entstehen. [1] Diese Formen machen jedoch nur einen kleinen Anteil der Diabetiker in Deutschland aus.

Beim Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch genetische [2, 3] sowie durch Umweltfaktoren [4, 5] determiniert ist. Hierbei kommt es zu einer T-Zell-vermittelten progressiven autoimmunen Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas. [6, 7] Es konnten bislang Antikörper gegen Proinsulin, Insulin, Inselzellen und verschiedene Inselzell-Proteine identifiziert werden. [6, 8] Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation lassen sich ein oder mehrere Antikörper nachweisen. In den Langerhans-Inselzellen kann eine Infiltration durch B- und T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen beobachtet werden. [3, 5] Die Aktivierung dieser Zellen resultiert in der Expression von inflammatorischen Zytokinen. Die dadurch vermittelte Insulitis führt schließlich zur Zerstörung der β -Zellen. [3] Das Ergebnis ist ein absoluter Insulinmangel, aufgrund dessen es bei den betroffenen Patienten zur Hyperglykämie kommt.

Über 90% der diagnostizierten Diabetiker leiden an Diabetes mellitus Typ 2. [1] Bei der Pathogenese handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Genetische Faktoren werden diskutiert, wobei polygenetische Effekte angenommen werden. [9, 10] Auch verschiedene Umweltfaktoren beeinflussen das Auftreten der Erkrankung. Es besteht eine enge Assoziation mit Übergewicht. [1, 10, 11]

Diabetes mellitus Typ 2 beruht auf einem relativen Insulindefizit, welches durch eine Kombination aus peripherer Insulinresistenz und einer gestörten β -Zell-Funktion verursacht

wird. [12, 13] Anfänglich kann die Insulinresistenz noch durch eine kompensatorische Steigerung der Insulinsekretion mit Hyperinsulinämie ausgeglichen werden. [14] Im Verlauf der Erkrankung wird jedoch die Kompensationsfähigkeit der β -Zellen erschöpft. Vermutlich liegt bei Diabetespatienten schon eine gewisse Prädisposition zu einer gestörten Insulinsekretion vor. Diese kann im Verlauf eines Diabetes noch zusätzlich durch erhöhte Blutzuckerspiegel verstärkt werden, ein Prozess der klinisch gut bekannt ist und auch als Glukotoxizität bezeichnet wird. [15, 16] Im fortschreitenden Krankheitsprozess lösen die erhöhten Glucosekonzentrationen oxidativen Stress [12, 16] und die lokale Produktion von Zytokinen aus [17, 18], was zur verstärkten Induktion der β -Zell-Apoptose führt. [15, 16] Diese Effekte werden schließlich noch durch die Lipotoxizität der gesteigerten Konzentrationen von freien Fettsäuren verstärkt. [19, 20] Dies führt letztlich zu einer sukzessiven Verschlechterung der Insulinsekretion und zum Diabetes mellitus Typ 2.

1.1.2 Komplikationen

Im Verlauf der Erkrankung entwickeln die Patienten als Folge der chronischen Störung der Blutzuckerregulation charakteristische Spätkomplikationen. Die durch die Hyperglykämie über verschiedene Prozesse ausgelösten Mikro- und Makroangiopathien [21] verursachen Defekte in verschiedenen Organsystemen, vor allem Augenschäden (Retinopathie), Nierenschäden (Nephropathie), Nervenschäden (Neuropathie) sowie Arteriosklerose, speziell koronare Herzkrankheit, zerebrale Durchblutungsstörung (Schlaganfall) und periphere arterielle Verschlusskrankheit. [22]

Diabetes ist assoziiert mit einer deutlich erhöhten Rate von kardiovaskulären Erkrankungen. [23] Die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit ist gegenüber Nichtdiabetikern auf etwa das 2- bis 4fache erhöht. [24] Sie stellt somit auch die Hauptursache für die erhöhte Morbidität und Mortalität des Diabetes-Patienten gegenüber dem Gesunden dar. [22, 25]

Auch die diabetische Nephropathie ist mit einer gesteigerten Mortalität verbunden. [22] Die diabetische Nephropathie gehört zu den Hauptursachen einer renalen Insuffizienz. Etwa 30-40% der Diabetes-Patienten entwickeln im Verlauf eine Nephropathie. [26] Und von diesen Patienten bilden etwa 15 - 20% eine renale Insuffizienz mit Dialysepflichtigkeit aus.

Die diabetische Retinopathie stellt die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes dar. In Deutschland sind die meisten Erblindungen immer noch auf eine Diabeteserkrankung zurückzuführen. Nach einer Erkrankungsdauer von 5 Jahren haben etwa 67% der Patienten mit

Diabetes Typ 1 eine Retinopathie entwickelt. [27] Und nach 20 Jahren lässt sich bei nahezu allen Typ-1-Diabetikern und bei 60-80% der Patienten mit Diabetes Typ 2 eine Retinopathie nachweisen. [28, 29] Aus der zunächst nicht-proliferativen Form entwickelt sich bei fortschreitender Erkrankung die proliferative diabetische Retinopathie. Diese betrifft 50% der Patienten mit Diabetes Typ 1 und 10% der Typ-2-Patienten. [28]

Die diabetische Neuropathie nimmt den Hauptanteil an den peripheren Neuropathien in der westlichen Welt ein. [30] Bis zu 60-70% der Diabetes-Patienten sind von ihr betroffen. [31] Während etwa 50% der Erkrankungen asymptomatisch verlaufen, ist auf der anderen Seite die diabetische periphere Polyneuropathie die führende Ursache von Ulzerationen und Amputationen im Bereich der unteren Extremitäten. [32] Die Autonome Neuropathie betrifft 50% der Patienten mit Diabetes. [33] Sie kann sich durch Tachykardien und Synkopen, Gastroparese oder Harninkontinenz klinisch manifestieren.

1.2 Steuerung der β -Zell-Funktion

1.2.1 Insulinsekretion

Die endokrinen β -Zellen des Pankreas sezernieren Insulin in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel. Extrazelluläre Glukose ist somit der wichtigste physiologische Stimulus der Insulinsekretion. Die Glukose gelangt über den Glukosetransporter GLUT2 (bei der Ratte), ein Membranprotein mit niedriger Affinität zu Glukose, in die β -Zelle. [34, 35] Dort wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert. [36] Die Glukokinase, auch Hexokinase IV, wirkt als Glukose-Sensor der β -Zelle. [36, 37] Die Phosphorylierung der Glukose scheint die Schrittmacherreaktion der Glykolyse zu sein. Unter aeroben Bedingungen ist das Hauptprodukt des glykolytischen Abbaus Pyruvat. Dieses wird in die Mitochondrien transportiert, wo es über die Pyruvatdehydrogenase im Citratzyklus verstoffwechselt wird. [38, 39] Das hierbei entstehende ATP und das somit veränderte ATP/ADP-Verhältnis führen über Hemmung ATP-sensitiver K^+ -Kanäle zu Elektrolytverschiebungen und schließlich zur Depolarisation der Zellmembran. [40] Diese Depolarisation bewirkt das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und den Ca^{2+} -Einstrom. [41] Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel löst letztendlich die Exozytose der sekretionsbereiten Insulingranula aus. [42]

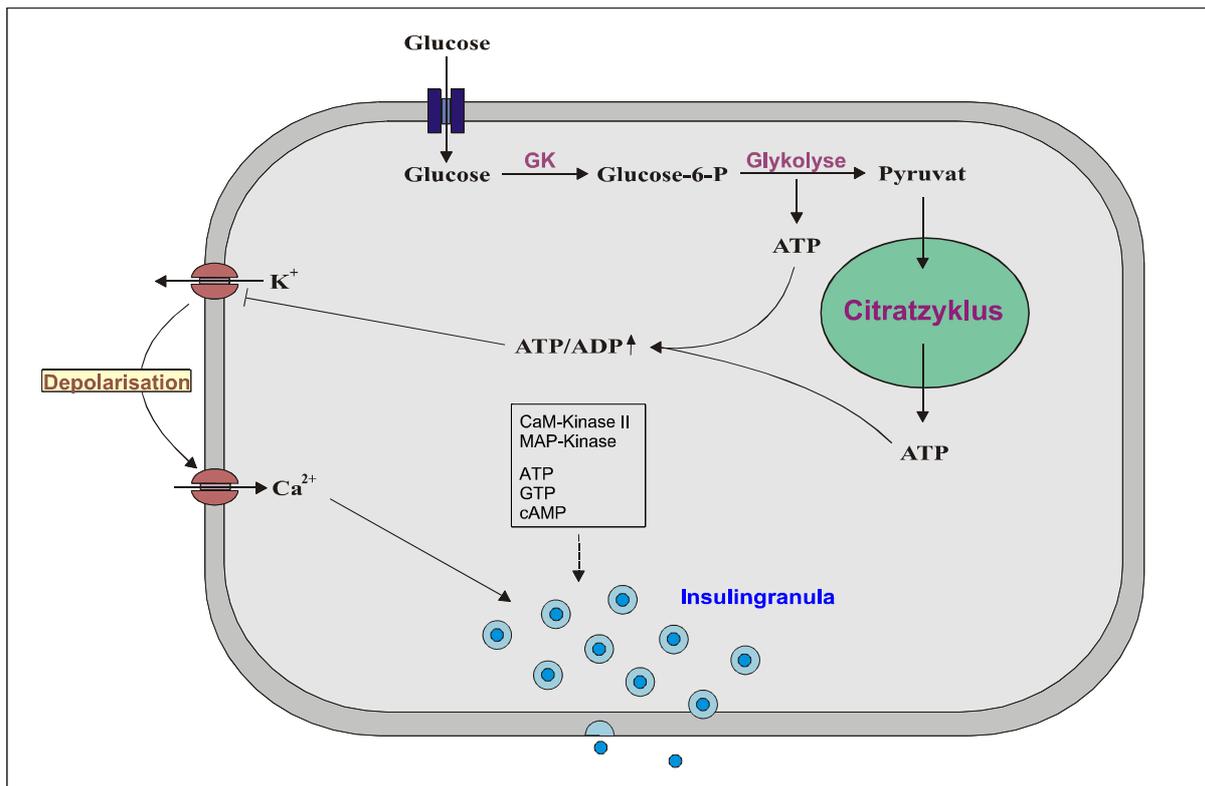


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Glukose-induzierten Insulinsekretion der β -Zelle des Pankreas

Der genaue Mechanismus der Induktion der Exozytose ist noch nicht geklärt. Eine Beteiligung verschiedener Proteinkinasen wird vermutet. In hierzu durchgeführten Untersuchungen wurde unter anderem die Aktivierung der CaM-Kinase II und der MAP-Kinase diskutiert. [43, 44, 45] Auch verschiedene Signalsubstanzen, wie GTP, ATP, cAMP und Acetylcholin scheinen bei der Vermittlung von Bedeutung zu sein. [43, 45, 46]

1.2.2 Insulinexpression

Die Regulation der Insulinexpression muss als komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Einflüsse verstanden werden. So haben unterschiedlichste Nährstoffe, Hormone, Transkriptionsfaktoren und hoch differenzierte Signalkaskaden einen modifizierenden Effekt auf die β -zellspezifische Expression des Insulingens.

Neben der stimulierenden Wirkung der Glukose auf die Insulinsekretion induziert sie über verschiedene Signalwege, z.B. CaM-Kinase II [44], und Transkriptionsfaktoren auch die Insulinexpression. PDX-1 (‘pancreatic-duodenal homeobox-1’), auch bekannt als IPF-1, IDX-1 oder STF-1, ist ein Transkriptionsfaktor der Familie der Homöobox-Proteine. [47, 48] Es wird in

den β -Zellen sowie in geringerem Maße in Somatostatin-produzierenden δ -Zellen [49] des endokrinen Pankreas produziert. Neben anderen Faktoren, wie Nkx6.1 [50, 51] und PAX-4, spielt PDX-1 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des Pankreas. [49, 52] Weiterhin hat es eine regulierende Funktion auf die Expression wichtiger β -Zell-Gene, wie GLUT2 [49, 53], GK [49, 53], IAPP [48, 49] und Insulin [48, 49, 53]. Desweiteren reguliert es den mitochondrialen Metabolismus [54] und seine eigene Expression. [55] Glukose aktiviert über noch nicht vollständig geklärte Signalwege die Phosphorylierung von PDX-1 [47, 56], was dessen Translokation vom Zytosol in den Zellkern bewirkt. [57, 58] Dort bindet PDX-1 an A-Box-Elemente des Insulin-Promoters und aktiviert schließlich die Insulin-Genexpression. [49, 59]

Weitere wesentliche Transkriptionsfaktoren gehören zur Gruppe der HNF's (hepatocyte nuclear factor'). [60] HNF-1 α und HNF-4 α steuern die Genexpression von GLUT2, L-Pyruvatkinase, Aldolase B und einiger mitochondrialer Enzyme. [61, 62] Zusätzlich regulieren sie sich gegenseitig. [60, 62] HNF-3 β scheint als übergeordneter Transkriptionsfaktor die Expression von HNF-1 α und HNF-4 α zu kontrollieren. [63] Daneben wird HNF-3 β eine regulierende Wirkung auf PDX-1 zugesprochen. [49, 64]

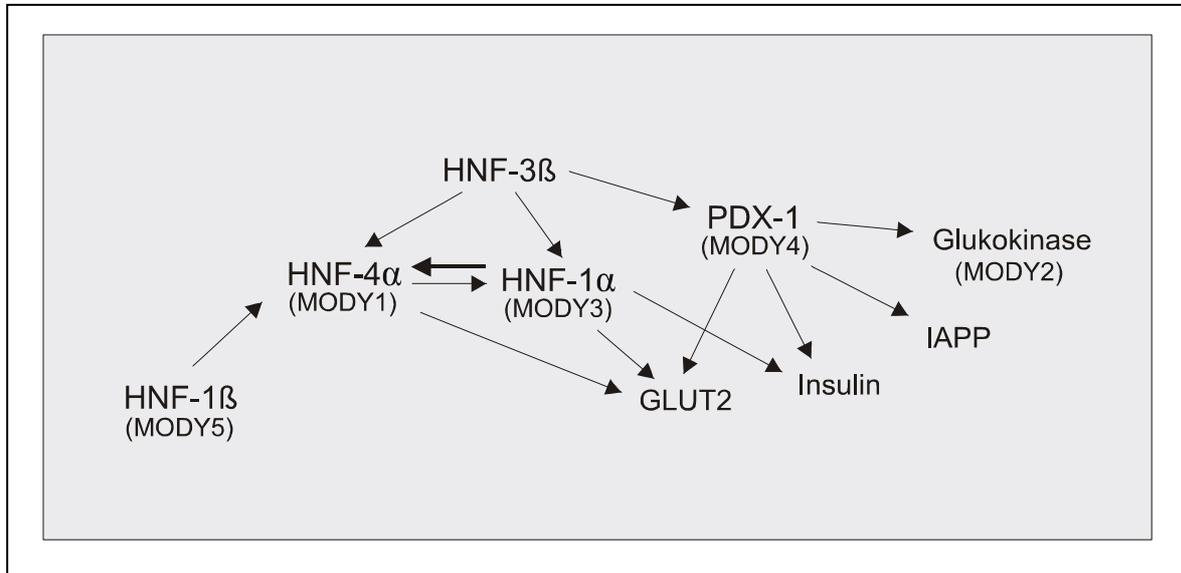


Abb. 1.2: Modell des regulatorischen Netzwerkes der Transkriptionsfaktoren.

Das Diagramm stellt die transkriptionelle Verknüpfung funktionell essentieller Gene der β -Zelle dar. Die Pfeile zeigen eine positive Regulation. In Klammern stehen die Formen des MODY-Diabetes, die bei entsprechendem Gendefekt entstehen.

1.3 PEDF

Pigment epithelium derived factor (PEDF) ist ein protektiver Faktor für eine Vielzahl von Nervenzellen. [65, 66] Ursprünglich wurde PEDF aus retinalen Pigmentepithelzellen als ein neurotropher Faktor isoliert, der die neuronale Differenzierung von Retinoblastomzellen Y-79 induziert. [67] In nachfolgenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass PEDF in zahlreichen Geweben und Zelltypen im ganzen Körper vorkommt. [68, 69] Unabhängig davon wurde PEDF als EPC-1 (early population doubling level cDNA-1) in Fibroblasten identifiziert. [70] EPC-1 scheint am Zellzyklus und an der Zellalterung beteiligt zu sein. [71, 72] Die Expression von EPC-1 mRNA und Protein ist während der G₀-Phase in jungen Zellen 100fach höher als in jungen wachsenden Zellen oder in alternden Zellen. [70, 73]

PEDF ist ein 50 kDa Glykoprotein und gehört zur Familie der Serin Proteasen Inhibitoren (Serpine), ohne jedoch Protease-hemmende Eigenschaften zu besitzen. [74, 75] Es hat eine 27%ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von α_1 -Antitrypsin, dem Prototyp der Serpine, [76] und zeigt die Serpin-typische sekundäre und tertiäre Struktur. [77]

Das humane PEDF-Gen ist 16kb lang und enthält 8 Exons. [P1] Es ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 in Region 13.3 lokalisiert, in direkter Nähe des Genlokus der autosomal-dominanten Retinitis pigmentosa. [68, 78]

Gleichzeitig zur biochemischen und strukturellen Differenzierung der retinalen Neurone schützt PEDF diese vor Zytotoxizität durch Peroxide. [79] Es wirkt zusätzlich als neuroprotektiver Faktor für Körnerzellen des Kleinhirns [80] und schützt diese Zellen gegen Glutamat-Toxizität [81] und Apoptose. [82] Spinale Motorneurone [83] und Neurone des Hippocampus [84] werden ebenso vor Glutamat-Toxizität bewahrt.

Dieser neuroprotektive Effekt wird offensichtlich über die Bindung an einen PEDF-Rezeptor erzielt. In neuronalen und retinalen Zellen konnte ein membranständiges Protein mit hoher Bindungsaffinität zu PEDF nachgewiesen werden. [85, 86] Ein Fragment von 44 Aminosäuren, entsprechend den Positionen 78-121 in der N-terminalen Region von PEDF, scheint die Bindung an den Rezeptor und schließlich die neuroprotektive Aktivität zu induzieren. [65, 66, 74] Die nachfolgende intrazelluläre Signalkaskade konnte im Zusammenhang noch nicht umfassend aufgeklärt werden. Sowohl die Induktion bioaktiver Lipide über Stimulation der Phospholipase A₂ [86] als auch eine Aktivierung der Transkription von NF κ B wurden bisher diskutiert. [87, 88]

Neben der neurotrophen und neuroprotektiven Wirkung gilt PEDF als wichtiger Inhibitor der Angiogenese und negativer Regulator des Gefäßwachstums. [89, 90, 91] PEDF scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese angiogener Augenerkrankungen zu haben. [92, 93]

Ebenfalls analysiert wird eine mögliche funktionelle Bedeutung von PEDF beim Tumorwachstum. Eine wachstumshemmende Wirkung auf verschiedene Tumorzellarten konnte bereits dokumentiert werden. [87; 94, 95]

1.4 Fragestellung der Arbeit

Pigment epithelium derived factor ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das bereits in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden konnte, dessen Funktion in den einzelnen Geweben jedoch bisher nicht vollständig geklärt ist. Neben der antiangiogenen Funktion konnte vor allem ein neuroprotektiver Effekt in unterschiedlichen Studien dargestellt werden. Es konnte in verschiedenen neuronalen Zellarten eine antiapoptotische Wirkung gezeigt werden.

Auch bei der Entstehung von Diabetes mellitus kommt es durch oxidativen Stress und lokal wirksame Zytokine zu einer apoptotischen Zerstörung der β -Zellen des Pankreas.

Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit sollte daher die Untersuchung einer möglichen Schutzwirkung von PEDF gegenüber zytotoxisch und oxidativ induzierter Apoptose in der β -Zelle der Langerhans-Inseln des Pankreas sein. Neben dieser Untersuchung eines potentiellen antiapoptotischen Effektes und des Einflusses von PEDF auf die Proliferation der β -Zelle sollte im Weiteren die Wirkung auf den β -Zell-Metabolismus analysiert werden. Hierbei stand die Betrachtung der Genexpression und Sekretion von Insulin im Vordergrund. Ergänzend wurde die Expression verschiedener weiterer, für die Funktion der β -Zelle essentieller Gene untersucht. Somit sollte schließlich eine mögliche Bedeutung von PEDF für die Entstehung oder Progression des Diabetes mellitus dargestellt werden.

2. Materialien

2.1 Chemikalien/Biochemikalien

Zellen

INS-1 Zellen	Prof. Dr. C. Wollheim, Genf
HEK-293 Zellen	ATCC

Plasmid

pCEP4-PEDF Plasmid	N. Bouck, Chicago, USA
--------------------	------------------------

Antikörper Westernblot

Mouse anti-human PEDF monoclonal ab	Chemicon, Temecula, USA
Goat HRP-linked anti-mouse IgG	Amersham Biosciences, Freiburg, Germany

Acrylamid	Merck, Darmstadt, D
Agarose	BioWhittaker, Rockland, USA
Aprotinin	Sigma, Saint Louis, USA
APS	Merck, Darmstadt, D
BES	Merck, Darmstadt, D
Bisacrylamid	Sigma, Saint Louis, USA
BSA	Sigma, Saint Louis, USA
Butanol	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, D
Dextran	Sigma, Saint Louis, USA
D-Glucose	Sigma, Saint Louis, USA
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
DMPC	Sigma, Saint Louis, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DNA-Leiter 100 bp	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

DNA-Probenpuffer 6x	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
D(N ₆)-Primer	Roche, Mannheim, D
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, D
DTT	Merck, Darmstadt, D
EDTA (Tritiplex III)	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma, Saint Louis, USA
FCS	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Sigma, Saint Louis, USA
HEPES	Merck, Darmstadt, D
Imidazol	Merck, Darmstadt, D
Interleukin-1 β	Sigma, Saint Louis, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Kits	
DNase	Qiagen, Hilden, D
High Pure PCR Product Purification	Roche, Mannheim, D
dye terminator	Amersham Life Science, Freiburg, D
Rat Insulin ELISA	Crystal Chem, Downers Grove, USA
Centricon Plus-20	Millipore, Billerica, USA
MTS-Assay	Promega, Madison, USA
Leupeptin	Sigma, Saint Louis, USA
L-Arginin	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	BioWhittaker, Rockland, USA
Linolsäure konjugiert	Sigma, Saint Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Mannitol	Sigma, Saint Louis, USA
2-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm, D
Methanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Amersham Life Science, Freiburg, D
M-MuLV Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim, D

Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	Sigma, Saint Louis, USA
Ni-NTA resin	Qiagen, Hilden, D
Palmitinsäure	Sigma, Saint Louis, USA
PBS	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
PEDF rekombinant	Chemicon, Temecula, USA
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
PMSF	Boehringer, Mannheim, D
Primer	
α-Tubulin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glukokinase	Invitrogen, Karlsruhe, D
GLUT2	Invitrogen, Karlsruhe, D
HNF4α	Invitrogen, Karlsruhe, D
IAPP	Invitrogen, Karlsruhe, D
Insulin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nkx6.1	Invitrogen, Karlsruhe, D
PDX-1	Invitrogen, Karlsruhe, D
PEDF	Invitrogen, Karlsruhe, D
Proteinleiter biotinyliert	Cell Signaling, Beverly, USA
RNAsin	Promega, Madison, USA
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
RT-Puffer	Roche, Mannheim, D
SDS	Sigma, Saint Louis, USA
SYBR green I	FMC Bio Products, Rockland, USA
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tavanic	Aventis, Frankfurt/M., D
TNF-α	Sigma, Saint Louis, USA
Tris Acetat	Merck, Darmstadt, Germany
Tris Base	Merck, Darmstadt, D

Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm, D
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma, Saint Louis, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, D

2.2 Verbrauchsmaterial

Combitips	Eppendorf, Hamburg, D
Deckelketten (8fach, PCR)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Gefäßketten (8fach, PCR)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten (96 Well)	TPP AG, Trasadingen, CH
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Millipore Corporation, Bedford, MA
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rundbodentubes (13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Roth, Karlsruhe, D
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schoell, Dassel, D
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 well)	TPP AG, Trasadingen, CH

2.3 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Düsseldorf, D
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Gel Imager Fujifilm	Fuji Foto Film Co Ltd., Japan
Gelkammer Blue Marine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Magnetrührer	IKA GmbH&Co.KG, Staufen, D
Mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg, D
pH Meter	Schott Geräte GmbH, Hofheim, D
PAGE-Elektrophorese-Zubehör	Biorad, Hercules, USA
Rotorgene 200	LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, D
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen, D
Sequenzier Mega BACE 1000	Amersham Life Science, Freiburg, D
Spektrophotometer Gene Quant	Amersham Life Science, Freiburg, D
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter	Wallac, Turku, Finnland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Vortex	IKA GmbH&Co.KG, Staufen, D
Western Blot Zubehör	Biorad, Hercules, USA

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 In vitro-Kultur

3.1.1.1 INS-1 Zellen

Für die vorliegende Arbeit wurden Ratteninsulinomzellen der Zelllinie INS-1 verwendet. Die INS-1 Zellen stellen eine hochdifferenzierte Tumorzelllinie dar und weisen einen mit β -Zellen vergleichbaren Phänotyp auf [96]. Sie wurden in RPMI 1640 Medium (2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 5,5 mM D-Glukose, 1 mM Natriumpyruvat, 10 % (v/v) FCS, 5mg Tavanic/500ml Medium, 0,36% (v/v) 2-Mercaptoethanol) bei 37°C in einer 5 %igen CO₂ -Atmosphäre kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte zweimal wöchentlich.

3.1.1.2 HEK-293 Zellen

Die für die Transfektion verwendeten HEK-293 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (2mM L-Glutamin, 5,5mM D-Glukose, 1mM Natriumpyruvat, 10 % (v/v) FCS, 5mg Tavanic/500ml Medium) bei 37°C in einer 5 %igen CO₂ -Atmosphäre kultiviert.

3.1.2 Herstellung von gestripptem Serum

Zur Entfernung von Wachstumsfaktoren und unveresterten Fettsäuren wurden 200 ml FCS mit 10 ml Aktivkohle-Dextran-Suspension 30 min bei 50°C inkubiert. Während der Inkubation erfolgte die Adsorption der metabolisch aktiven Substanzen an der Aktivkohle. Das nachfolgende 30-minütige Zentrifugieren bei 10.000 g und 4°C diente dazu, die mit Wachstumsfaktoren und Fettsäuren besetzten Aktivkohlepartikel durch Sedimentation zu separieren. Der Überstand wurde anschließend steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Aktivkohle-Dextran-Suspension

3,5 mM NaCl
125 mg Aktivkohle
12,5 mg Dextran
ad 25 ml mit Reinstwasser
ü.N. bei 4°C schütteln

3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Hämozytometers

Ein Hämozytometer ist eine Zählkammer mit einem Gitter aus Quadraten bestimmter Größe. Das Gitter enthält 9 Quadrate mit einer Fläche von 1mm^2 , einer Tiefe von 0,1 mm und somit einem jeweiligen Volumen von $1\mu\text{l}$. Die Kammer wurde mit der Zellsuspension gefüllt und unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Die Zellen in zwei der 9 Quadrate wurden gezählt, ein Mittelwert gebildet, um durch anschließende Multiplikation der gezählten Zellzahl mit 1000 die Zellzahl/ml zu berechnen.

3.1.4 MTS-Assay

Der MTS-Assay bzw. CellTiter 96[®] AQueousAssay stellt eine Methode zur Bestimmung der Anzahl proliferativer Zellen in einer Zellkultur und zur Messung der metabolischen Aktivität dar [97].

Die in metabolisch aktiven Zellen vorhandene Dehydrogenase aktiviert die NAD(P)H-abhängige Reduktion des MTS-Tetrazoliumsalzes zu einem Formazan-Produkt. Dieses ist im Zellkulturmedium löslich und kann daher direkt durch Absorptionsmessung bei 492nm bestimmt werden. Diese Menge des Formazan-Produktes ist proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur.

In die Wells der Platte mit den enthaltenen Zellen wurden im Anschluss an den Zellversuch $20\mu\text{l}$ der MTS/PMS-Lösung hinzugegeben. Anschließend folgte die Inkubation für 4 h bei 37°C und 5% CO_2 . Danach konnte die Absorption bei 492nm im Spectralphotometer gemessen werden.

MTS/PMS-Lösung

95% (v/v) MTS-Reagenz

5% (v/v) PMS-Reagenz

3.1.5 Herstellung von rekombinantem PEDF nach Transfektion**3.1.5.1 Transfektion**

Zur Herstellung von PEDF durch Transfektion wurde pCEP4-PEDF Plasmid verwendet. Das Plasmid stammte von N. Bouck (Chicago), die PEDF mRNA mit 6 Histidin-Resten am Carboxyl-Terminus in pCEP4 kloniert hatte, um daraus rekombinantes PEDF herzustellen. [90] Als Zellmodell zur Produktion des transfizierten PEDF wurden HEK-293 Zellen gewählt, da diese eine große Reproduktionsrate sowie eine hohe Effizienz der Transfektion und der Proteinproduktion aufweisen [98]. Die HEK-293 Zellen wurden in Wells mit ca. 10cm Durchmesser (ca. 75cm²) vereinzelt ausgesät, mit Medium angesetzt und anschließend 4 h zum Anwachsen stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden 20µg Plasmid-DNA zu 1ml Transfektionsansatz gegeben. Nach 20 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Diese wurden dann für 16 h bei 3% CO₂ und nach erneutem Mediumwechsel für weitere 24 h bei 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und weiter verarbeitet.

Transfektionsansatz

50% (w/v) 2xBBS-Puffer

5% (w/v) 2,5M CaCl₂·2H₂O2xBBS-Puffer (pH 6,95)

50mM BES

280mM NaCl

1,5mM Na₂HPO₄·2H₂O

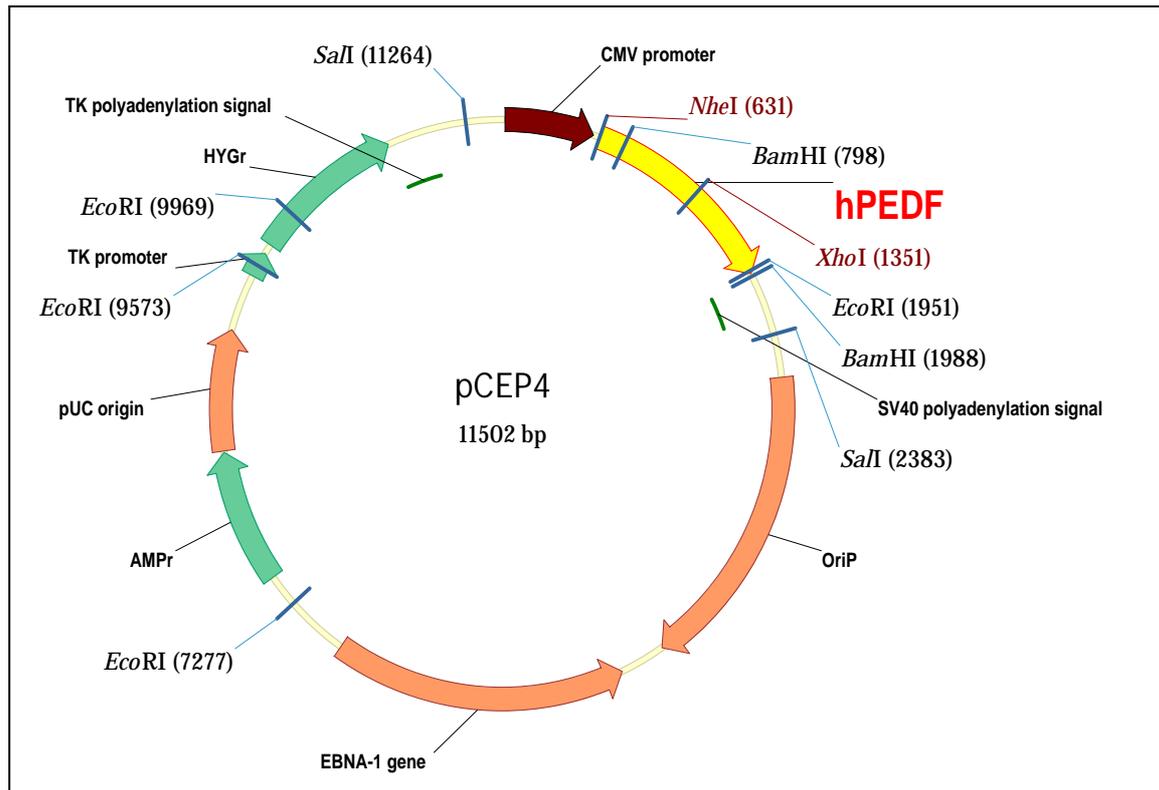


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des pCEP4-PEDF Plasmids

3.1.5.2 Aufreinigung

Nach Durchführung der Transfektion zur Herstellung von rekombinatem PEDF musste das Medium nachfolgend aufgereinigt werden. Dazu wurde das Medium zu je 1ml in Tubes abgefüllt. Pro Tube wurde 20µl Ni-NTA resin hinzugefügt und bei 4°C für 30 min gemixt. Anschließend wurde bei 15.000 g für 10 s zentrifugiert. Dadurch bildete das Ni-NTA resin ein Pellet. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet zweimal mit 100µl Waschpuffer gespült und dazwischen erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte das Auflösen des Proteins durch dreimalige Zugabe von 20µl Elutionspuffer und zwischenzeitliches Zentrifugieren bei 15.000 g für 10s. Der entfernte Überstand mit dem enthaltenen Protein wurde in ein neues Tube überführt.

Waschpuffer

50mM NaH₂PO₄, pH 8,0

300mM NaCl

20mM Imidazol

Elutionspuffer

50mM NaH₂PO₄, pH 8,0

300mM NaCl

250mM Imidazol

3.1.5.3 Anreicherung des rekombinanten Proteins

Aufgrund der geringen Menge an PEDF in der Lösung wurde eine Konzentrationsreaktion mit Hilfe des Centricon Plus-20 Kits (*Millipore*) durchgeführt. Die Lösung wurde dazu in einen Filter Cup gegeben, welches sich auf einem Auffang-Tube befand. Durch Zentrifugation bei 4.000 g für 1 min wurde der Lösungspuffer in das Tube filtriert, während das Konzentrat im Filter Cup gesammelt wurde. Danach wurde der Filter Cup entfernt und auf ein Sammel-Tube gesteckt. Abschließende Zentrifugation bei 1.000 g für 1 min führte zu einer etwa 100fach konzentrierten PEDF-Lösung. Das Protein wurde somit aus der ursprünglichen Lösung herausfiltriert und in einem kleineren Volumen wieder aufgelöst, womit eine höhere Konzentration des Proteins für nachfolgende Versuche erreicht wurde.

3.1.5.4 Coomassie-Blue-Färbung

Mit dieser Färbung lassen sich alle auf dem Gel vorhandenen Proteinbanden sichtbar machen. Sie diente in diesem Fall zur Kontrolle, ob nur das Protein PEDF aufgereinigt wurde, um mit einer Gesamtproteinbestimmung nachfolgend die PEDF-Konzentration zu berechnen. Die Färbung wurde im Anschluss an eine SDS-PAGE durchgeführt.

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 12 h in eine Coomassie-Färbelösung gelegt. Die Färbelösung wurde anschließend abgenommen und das Gel für 5 Minuten in die Entfärbelösung gelegt. Dieser Vorgang wurde 3x wiederholt. Die entsprechenden Banden werden dabei auf dem Gel sichtbar.

Färbelösung

45% (v/v) Methanol

45% (v/v) H₂O bidest

10% (v/v) Essigsäure

0,25g Coomassie Brilliant Blue

Entfärbelösung

45% (v/v) Methanol

45% (v/v) H₂O bidest

10% (v/v) Essigsäure

3.1.5.5 Proteinbestimmung nach Stoschek

Zur Quantifizierung der Proteinmengen in den Proben diente die nach Stoschek modifizierte Methode nach Bradford. Bei Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue G verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm. Die gemessene Absorption bei 595nm ist dann proportional zur Proteinmenge in der Probe. Die durch unterschiedliche Proteine bedingten Messfehler wurden durch Zugabe von 70mM NaOH reduziert.

Es wurden je 1µl Proteinprobe, BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen (0,5, 1, 2, 3, 4 µg/µl) als Proteinstandards sowie eine Leerprobe, die nur Lysepuffer enthielt, als 4facher Ansatz auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden je 250µl Coomassie Brilliant Blue Reagenz hinzugegeben. Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde dann die Absorption mit dem Spectralphotometer gemessen. Von diesen Messwerten wurde der Leerwert des Wells mit Lysepuffer subtrahiert und die Proteinmenge PEDF anhand der Standardkurve errechnet.

Coomassie Brilliant Blue Reagenz

10% (v/v) H₃PO₄ (85%ig)

4,75% (v/v) Ethanol

0,01% (w/v) Coomassie Blue G250

3.1.6 Durchführung der In vitro-Studien

3.1.6.1 zytotoxisch und oxidativ induzierte Apoptose

Die INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Hierzu wurde zunächst Medium mit 3mM Glukose und ungestripptem FCS gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Durch diese Vorinkubation erfolgte das Anhaften der Zellen am Boden. Die nachfolgende Stimulation wurde mit gestrippten FCS durchgeführt. Nach Inkubation für 48 h erfolgte die Analyse mittels MTS-Assay.

Der Einfluss von Zytokinen wurde durch Stimulation mit IL-1 β in unterschiedlichen Konzentrationen (50-1500pg/ml) sowie mit einer Kombination von IL-1 β (1500pg/ml) und TNF- α (10ng/ml) untersucht. Zu diesen Ansätzen wurde dann 20nM PEDF bzw. PBS, entsprechend der Lösungsmenge von PEDF, hinzugegeben. Analog dazu wurde als Modell für oxidativen Stress eine Stimulation der INS-1 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von H₂O₂ (0,1-1mM) durchgeführt.

Parallel dazu wurde durch Stimulation mit unterschiedlichen Mengen von PEDF eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von PEDF untersucht. Die Zellen wurden hierfür mit PEDF-Konzentrationen von 0 bis 40nM und IL-1 β (50-1500pg/ml) inkubiert.

3.1.6.2 Proliferation

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Glukose auf das Wachstum der INS-1 Zellen. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^3 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Nach Vorinkubation von 24 h mit ungestripptem FCS wurde der Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen bei Glukosekonzentrationen von 3mM, 16,5mM sowie 3mM Glukose mit 13,5mM Mannitol inkubiert. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel und schließlich nach 96 h die Analyse mittels MTS-Assay.

Um die Wirkung von PEDF auf das Wachstum der INS-1 Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze mit nachfolgender Analyse durch Zellzählung bzw. MTS-Assay verwendet.

Die INS-1 Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Well bzw. in 96-Well-Platten mit 5×10^3 Zellen/Well ausgesät und in Medium mit ungestripptem FCS kultiviert. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte der Mediumwechsel mit gestrippten FCS.

In eine Probenreihe wurde 40 nM PEDF gegeben, den anderen Proben wurde eine entsprechende Menge PBS hinzugefügt. Alle 48 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 72, 96, 120, 144 und 168 h erfolgte in den 6-Well-Platten jeweils die Zellzählung mit dem Hämocytozometer. Die 96-Well-Platten wurden mit Hilfe des MTS/PMS-Assay analysiert.

3.1.6.3 Expression von Insulin und weiterer β -Zell-Gene

Die INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und in RPMI 1640 Medium mit ungestripptem FCS kultiviert.

Dabei wurde in die Wells einer Reihe Medium mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen von 3 mM Glukose, 16,5 mM Glukose und 3 mM Glukose + 13,5mM Mannitol gegeben und die einzelnen Reihen dann mit verschiedenen Reagenzien versetzt. Es wurden Versuche mit Messung der Insulinexpression bei Stimulation mit selbständig transfiziertem PEDF und kommerziell erworbenem PEDF durchgeführt. Nach 48 h bzw. nach 120 h erfolgte dann die Aufbereitung und RNA-Extraktion der Proben.

Zusätzlich wurden analog noch weitere Versuche zur Bestimmung anderer β -Zell-Gene mit selbständig transfiziertem PEDF und einer Inkubationszeit von 48 Stunden und anschließender RNA-Extraktion durchgeführt.

3.1.6.4 Insulinsekretion

Die INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen mit 1ml Medium mit 3mM Glukose und ungestrippten FCS auf 24-Well-Platten ausgesät. Nach 24-stündiger Vorinkubation erfolgte ein Mediumwechsel. Es wurden nun 3ml Medium mit 3mM Glukose und gestripptem FCS benutzt, wobei in zwei Reihen zusätzlich 40nM PEDF und in zwei Reihen als Kontrolle eine entsprechende Menge PBS hinzugegeben wurde. Nach Inkubation für 72 h wurde das Medium entfernt und die Proben wurden bei Zugabe von je 1ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer ohne Glukose für 30 min inkubiert. Danach erfolgte der Austausch gegen 1ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit festgelegter Glukosemenge. Hier wurden Glukosekonzentrationen von 2,5mM, 12mM und 24mM verwendet. Daneben ist einer Probenreihe mit 2,5mM Glukose zusätzlich 30mM KCl hinzugefügt worden. Nach 30minütiger Inkubation wurde der Überstand für den ELISA entfernt.

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

1mM CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5mM NaH ₂ PO ₄
5mM NaHCO ₃	0,5M MgSO ₄
25mM HEPES	
125mM NaCl	
3,6mM KCL	

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Extraktion

Die gesamte Extraktion erfolgte auf Eis. Zunächst wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 1ml Trizol lysiert und ließen sich mit dem Zellschaber vom Boden ablösen und in ein 1ml-Tube überführen. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgend ebenso langer Zentrifugation bei 12000g und 4°C wurde die Lösung von der am Boden des Röhrchens haftenden Zellwand getrennt und konnte in ein neues Tube überführt werden. Nach Zugabe von 0,2ml Chloroform, kurzem Vortexen, 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneuter Zentrifugation bei oben genannten Bedingungen entstanden 3 Phasen. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA, während DNA und Protein in der unteren und der Interphase konzentriert waren. Die wässrige Phase wurde mit der Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt. Zur Fällung der RNA aus dieser wässrigen Phase wurde 0,5ml Isopropanol hinzugegeben. Anschließend erfolgte nach kurzem Vortexen eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Die anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000g und 4°C ergab die RNA als Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Zur Reinigung der RNA musste die Fällung ein zweites Mal wiederholt, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bis zur Transparenz getrocknet werden. Abschließend erfolgte das Lösen der RNA in 50µl DMPC behandeltem Wasser und die Lagerung bei -20°C.

DMPC-Wasser

1 % (v/v) DMPC
50 % (v/v) Ethanol

3.2.2 DNase-Verdauung

Zur Vermeidung einer Störung der PCR durch etwaige Kontamination mit genomischer DNA wurde nach der RNA-Extraktion eine zusätzliche DNase-Verdauung mittels eines RNase-Free DNase Sets (*Qiagen*) durchgeführt.

Hierzu wurden 20µg RNA mit 130µl RLT-Puffer, der zuvor mit 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol versetzt wurde, und 130µl Ethanol 70%ig vermischt und in ein RNeasy-Säulen-Tube gegeben. Durch Zentrifugation bei 8.000 g für 30 s wurde die RNA an die Membran der Säulenmatrix gebunden. Die Lösung am Boden des Tubes konnte dann verworfen werden. Der Großteil der enthaltenen DNA wird hierbei bereits entfernt. Zur vollständigen Eliminierung wurde anschließend noch die Behandlung mit DNase ergänzt. Nach einem Waschvorgang mit 300µl RW-1 Puffer und nachfolgender erneuter Zentrifugation wurde ein Gemisch aus 10µl DNase und 70µl RDD-Puffer auf die Membran des Säulen-Tubes gegeben. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur erfolgte das erneute Waschen mit 300 µl RW-1 Puffer und ein zweimaliger Waschvorgang mit 500µl RPE-Puffer. Anschließend konnte die RNA durch Zugabe von 30µl DMPC-Wasser auf die Membran und Zentrifugation für 3 min bei 8.000 g herausgelöst und für die weitere Verarbeitung mit PCR genutzt werden.

3.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde mittels eines Spektralphotometers anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration wurde wie folgt errechnet: $A_{260} \times \text{Faktor} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Konzentration, wobei als Faktor für RNA 40 µg/µl eingesetzt wurde.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten RNA wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient aus der Extinktion bei 260 und 280 nm errechnet. Bei einem Quotienten von 1,7 für RNA wurde die Präparation als ausreichend rein bezeichnet.

3.2.4 cDNA-Synthese

Mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) ist eine Umschreibung von mRNA in cDNA möglich. Dafür wurde 1µg der isolierten RNA zur vollständigen Denaturierung zusammen mit 5pmol/µl dN₆-Primer und Reinstwasser auf ein Endvolumen von 12,5µl eingestellt und für 5 min

auf 95°C erhitzt und danach unverzüglich auf Eis überführt. Pro Ansatz wurden 1x RT-Puffer, 40 U RNAsin, 1 mM dNTPs und 20 U M-MuLVReverse Transkriptase als Mastermix zugegeben. Im Gradientencycler erfolgte die Reverse Transkription unter definierten Bedingungen. 10 min wurde den Primern bei 23°C die Bindung an die RNA ermöglicht. Danach erfolgte die Umschreibung der mRNA für 1h bei 37°C. Durch 5-minütiges Erhitzen bei 95°C wurde das Enzym abschließend inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.5 DNA-Amplifikation

3.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR ist eine gezielte In vitro-Amplifikation von DNA-Fragmenten möglich, die im Bereich zwischen den Bindungsstellen zweier Primer an der Ziel-DNA liegen.

Da es unzählige Anwendungsmöglichkeiten mit unterschiedlichen Versuchsprotokollen gibt, war es zunächst erforderlich, ein Protokoll zu erschaffen, das auf die experimentelle Situation eingestellt ist, um optimale Bindungen für die PCR zu erreichen. Um die Effizienz der PCR möglichst hoch zu halten und Probleme, wie zu geringe Produktmenge oder zu viele Nebenprodukte zu vermeiden, wurden einflussreiche Faktoren entsprechend angepasst.

Im Verlauf der Etablierungsphase wurden verschiedene Primer mit Produkten unterschiedlicher Länge von 144, 167, 241, 397 bp verwendet. Letztendlich erschienen die Primer mit der Produktlänge von 144 bp aufgrund der gut abgrenzbaren Produktbande als besonders günstig.

Die zunächst verwendete cDNA-Menge von 1µl pro Ansatz musste aufgrund der relativ geringen Produktmenge im weiteren Verlauf schnell erhöht werden. In der Endkonsequenz wurde eine cDNA-Menge von 8µl bevorzugt. Größere Mengen führten zur Entstehung einer RNA-Bande, geringere Mengen bedeuteten eine Verkleinerung der Produktbande.

Die Magnesiumkonzentrationen wurden von 1 bis 4 mM variiert. Optimale Bedingungen wurden schließlich bei einer Konzentration von 2mM erreicht. Bei geringeren Konzentrationen war die Produktmenge deutlich reduziert. Bei höheren Konzentrationen waren vermehrt Nebenprodukte entstanden.

Es wurden weiterhin geeignete Primerkonzentrationen ermittelt. Hierbei wurden in der Etablierungsphase Konzentrationen von 0,2 bis 2pmol/µl verwendet. Aufgrund der großen Menge an cDNA wurde zur Optimierung der Reaktion eine relativ hohe Konzentration von 1pmol/µl gewählt.

Hinsichtlich der Menge eingesetzter Taq-Polymerase liegen günstige Bedingungen im Normalfall zwischen 1 bis 2,5U. Da höhere Enzymkonzentrationen mit einer verstärkten Bildung von Nebenprodukten einhergingen, wurde letztlich die niedrige Enzymkonzentration von 1U verwendet.

Die Reaktion erfolgte schließlich in einem 50µl Ansatz. Dieser enthielt 1x PCR-Puffer, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 1pmol/µl upstream- und downstream-Primer, 1 U Taq-Polymerase und 8 µl cDNA.

Die PCR wurde im Mastercycler durchgeführt. Die initiale Denaturierung der cDNA erfolgte bei 95°C für 2 min. Alle nachfolgenden Denaturierungsschritte wurden für jeweils 40 s bei 95°C durchgeführt. Durch anschließendes Herabsetzen der Temperatur für 1 min auf 58°C wurde die Anlagerung der Primer an die Matrizenstränge ermöglicht (*Annealing*). Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur wurde zunächst ein Versuch mit einem Temperaturgradienten zwischen 49°C und 61,5°C durchgeführt. Hierbei führten Temperaturen zwischen 58°C und 60°C zu guten Produktmengen, woraufhin dieser Temperaturbereich nachfolgend noch einmal getestet wurde. Die Reaktion zeigte bei einer Temperatur von 58°C mit einer Inkubationszeit von 1 min die besten Ergebnisse.

Die Verlängerung der komplementär zum Matrizenstrang angelagerten Primer durch die Taq-Polymerase erfolgte durch die Erhöhung der Temperatur für 2 min auf 72°C (*Elongation*). Die nachfolgenden 45 Zyklen stellten eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten Fragmente sicher. Abschließende 10 min bei 72°C dienten zur Beendigung laufender Elongationsvorgänge.

3.2.5.2 Semiquantitative PCR

Mit Hilfe der Realtime-PCR ist es möglich, über die semiquantitative Bestimmung der cDNA auf die relative Menge gebildeter mRNA Rückschlüsse zu ziehen [99]. Um den Einsatz vergleichbarer cDNA-Mengen zu sichern, wurden parallel Polymerase-Ketten-Reaktionen von einem so genannten Haushaltsgen, in diesem Fall α -Tubulin, angesetzt. Grundlage hierfür ist die Annahme, dass Haushaltsgene unter variierenden Bedingungen eine konstante Expressionsaktivität aufweisen. Um den Einfluss von Störungen zu minimieren, erfolgte eine Dreifachbestimmung von jeder Probe. Über die Bildung des Insulin/ α -Tubulin-Quotienten der gemessenen Werte wurde die Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet.

Zur Ermittlung der für die Quotientenbildung benötigten absoluten cDNA-Mengen wurde das Auswerteprogramm RotorGene verwendet. Der während der Amplifikation erfolgende Einbau des fluoreszierenden Agens SYBR Green I in die cDNA ermöglichte die graphische Darstellung der Fluoreszenz und somit der Menge an amplifizierter cDNA in Abhängigkeit von der Zyklenzahl [$F=f(t)$]. Die Konzentration der spezifischen cDNA-Moleküle verdoppelt sich mit jedem Zyklus und steigt demnach exponentiell mit der Zyklenzahl.

Zur Berechnung der unbekanntenen Mengen wurde eine Probe als Standard in konzentrierter und 5fach verdünnter Form verwendet. Zunächst wurden auch Verdünnungen von 1:20 und 1:50 getestet, jedoch war bei höherer Verdünnung die Anfälligkeit für Primer-Dimer-Artefakte und andere Produkte aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial stark erhöht, so dass die Reaktion erheblich gestört war. Dem konzentrierten Standard und den Verdünnungen wurden willkürlich Konzentrationen von 1000 und 200 zugeordnet. In Anbetracht der hohen Effizienz der Reaktion in den ersten Zyklen erfolgte die Messung der Zyklenzahl im Anstiegsbereich der Exponentialfunktion. Unter Bezugnahme auf die Standards, bei denen die Zyklenzahl einer bekannten Konzentration zugeordnet werden konnte, wurden aus den Zyklenzahlen der Proben die absoluten Konzentrationen berechnet.

Die Ermittlung der Zyklusabstände zwischen Standardkurven von konzentrierten und verdünnten Standards ermöglichte die Beurteilung der Qualität der PCR. Der Abstand zwischen den Anstiegsbereichen der Exponentialfunktion beider Standardkurven sollte im Idealfall bei einer 1:5 Verdünnung 2,3 Zyklen betragen. Um eine Kontamination auszuschließen, wurde bei jeder PCR ein Kontrollansatz, der anstatt cDNA Wasser enthielt, zusätzlich untersucht. Anhand der Darstellung der Schmelzkurven konnte eine Aussage über die Qualität der entstandenen Produkte getroffen werden. Da SYBR Green die Eigenschaft besitzt, jegliche doppelsträngige DNA zu binden, mussten bei der Auswertung eventuell entstandene unspezifische doppelsträngige DNA-Moleküle, insbesondere Primer-Dimere ausgeschlossen werden. Primer-Dimer-Artefakte und andere Nebenprodukte mit niedrigem Schmelzpunkt verschoben die Kurvenverläufe in Richtung niedriger Zyklenzahl und täuschten somit eine höhere Ausgangsmenge an spezifischer cDNA vor. Proben, die aufgrund unspezifischer Produkte neben ihrer Schmelzkurve einen weiteren Peak aufwiesen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Zunächst erfolgte die Bestimmung von Insulin und dem Haushaltsgen α -Tubulin. Die Ansätze hierfür bestanden dann aus 1x PCR-Puffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM dNTPs, 0,5 pmol/ μ l upstream- und downstream-Primer, 0,5x SYBRGreen, 1 U Taq-Polymerase und 2 μ l cDNA bei einem totalen Volumen von 20 μ l. Die Amplifikation wurde stets im Triplet durchgeführt. Die spezifische Realtime-PCR zur Amplifikation der Insulin- und α -Tubulin-Fragmente lief in

folgenden Schritten ab. Nach initialer Denaturierung für 1 min bei 98°C folgten 45 Zyklen von Denaturierung für 30 s bei 98°C, Annealing für 40s bei 56°C, Elongation für 40s bei 72°C und Inaktivierung der Taq-Polymerase für 15min bei 85°C.

Um weitere Aussagen über den Einfluss von PEDF auf die β -Zell-Funktion zu treffen, wurde im Folgenden die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren und β -Zell-Gene untersucht.

Zunächst mussten passende PCR-Protokolle für die einzelnen β -Zell-Gene etabliert werden. Als geeignete Menge Primer stellten sich einheitlich 0,5 pmol/ μ l heraus. Die dNTP's wurden in einer Konzentration von 0,25 mM verwendet. Pro Ansatz wurden außerdem jeweils 1,25 U Taq-Polymerase benutzt. Entsprechend des Protokolls der Firma Rotorgene wurde das fluoreszierende Agens SYBR Green I von der Originallösung (10.000x) auf 0,5x verdünnt. Da die Fluoreszenz während der Amplifikation den Messbereich überstieg, wurde die Konzentration nochmals um die Hälfte auf 0,25 SYBR Green I gesenkt. Die Menge von eingesetztem $MgCl_2$ musste bei den einzelnen Amplifikationen der unterschiedlichen Gene variiert werden. (siehe Tabelle 3.1) Die verwendete cDNA-Menge lag bei 2 μ l pro Ansatz.

Als Temperatur der Denaturierung wurde aufgrund der hohen DNA-Schmelzpunkte eine Temperatur von 98°C eingestellt. Die relativ kurze Denaturierung von 20s verhinderte ein schnelles Absinken der Taq-Polymerase-Aktivität. Für das nachfolgende Annealing wurden verschiedene Temperaturen getestet. Die β -Zell-Gene erforderten schließlich unterschiedliche Temperaturen. (siehe Tabelle 3.1)

Primer		Primersequenzen	$MgCl_2$	Annealing-Temperatur
Insulin	low up	TTTTGTCAAACAGCACCTTTGT CTCCACCCAGCTCCAGTTGT	2,5mM	56°C
α -Tubulin	low up	GAGATGACTCCTTCAACACCTT CAATGATCTCCTTGCCAATG	2,5mM	56°C
PDX-1	low up	AAAGGGAGATGAACGCGG CGGACATCTCCCCATACG	2,5mM	60°C
GLUT2	low up	AGGCGTCTGGTGTCTGATG TGGGTTCCCTCCAGTTCG	2,5mM	60°C
Glukokinase	low up	TCTTCACGCTCCACTGTC TGACAGAGCCAGGATGGAG	2mM	60°C
Nkx6.1	low up	GGGCTGCGTGCTTCTTTCTCCA TCTTCTGGCCTGGGGTGATG	2,5mM	60°C
IAPP	low up	CTCTGCCACATTCCTCTTCC CAACCCTCAGGTGGACAAAC	2,5mM	57°C
HNF4 α	low up	GTGGAGTCTCAGGGGTGG TACATCAACGACCGGCAG	2mM	63°C

Tab. 3.1: Darstellung der etablierten β -Zell-Gene: Primersequenzen, Konzentration von $MgCl_2$ im Ansatz und Annealing-Temperatur

Die Inkubationszeit wurde einheitlich mit 40s festgelegt. Die Polymerisation der cDNA-Stränge erfolgte bei 72°C für 20s. Höhere Extensionszeiten förderten in großem Maße die Bildung unspezifischer Nebenprodukte. Die Zyklenzahl wurde aufgrund der geringen Ausgangskonzentration der Matrize von zunächst 20 auf 45 Zyklen erhöht. Somit folgten also nach initialer Denaturierung für 5 min bei 98°C 45 Zyklen von Denaturierung für 20 s bei 98°C, Annealing für 40 s bei einer jeweils spezifischen Temperatur sowie Elongation für 20 s bei 72°C.

3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Darstellung des gewonnenen PCR-Produktes und zur Gewinnung eines DNA-Fragmentes wurde die DNA auf horizontalen Agarosegelen aufgetrennt.

Bei der Agarosegel-Elektrophorese bewegen sich negativ geladene DNA-Fragmente in einem elektrischen Gleichstromfeld durch ein Agarosegel definierter Porengröße zum positiven Pol (Anode). Dabei stellt die Molekülgröße den limitierenden Faktor für die Wanderung der Fragmente dar. Kleinere DNA-Moleküle können bei definierter Porengröße innerhalb einer bestimmten Zeit eine längere Wegstrecke zurücklegen als größere, wodurch eine Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe erfolgt. Für kleinere Fragmente als 1 kb wurden Gelkonzentrationen zwischen 1 % und 2 % gewählt. Die notwendige Menge Agarose wurde in entsprechender Menge Ethidiumbromid-haltigen TAE Puffer's eingerührt und durch Erhitzung in einer Mikrowelle bis zum Siedepunkt vollständig gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung zum Aushärten in die Gelelektrophoresekammer gegossen.

Währenddessen wurden 20µl der cDNA aus der PCR mit 5 µl Probenpuffer (5x) versetzt und in die Taschen des polymerisierten Gels pipettiert. Als Größenstandard diente aufgrund der relativ geringen Länge des PEDF-Fragmentes eine 100 bp Leiter. Davon wurden 0,5 µl mit 0,5 µl Probenpuffer versetzt und auf ein Volumen von 3 µl mit Reinstwasser aufgefüllt. 6µl der Leiter wurden im Gel neben den Proben plaziert. In der horizontalen Gelelektrophoresekammer mit 1x TAE als Laufpuffer wurde die DNA bei einer Spannung von 110 V aufgetrennt. Durch Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid in die DNA konnte sie anhand eines *Gel Imagers* sichtbar gemacht werden.

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Acetat (Tris-Base in Eisessig)

0,05 M EDTA pH 8,0

Ethidiumbromid-Stock

1mg/ml in Reinstwasser

TAE-Gebrauchslösung

1x TAE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid

3.2.7 Isolierung und Aufreinigung des cDNA-Fragmentes aus der Agarose-Gelmatrix und Präparation der Sequenzierreaktion

Die gewünschte cDNA-Bande wurde in einem horizontalen, TAE-haltigen Agarose-Gelsystem aufgetrennt und unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm lokalisiert. Mit Hilfe eines Skalpellens wurde die cDNA-Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Das nachfolgende Herauslösen der cDNA aus der Gelmatrix erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (*Roche*). Dazu wurde das Gelstück mit 300 µl Puffer/100 mg Gel versetzt, gevortext und 10 min unter leichtem Schütteln bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Isopropanol/100 mg erfolgte die Filtration der Gellösung durch Zentrifugation im Filter-Tube bei 13000 rpm für 1 min bei Raumtemperatur. Die gefilterte Lösung wurde verworfen und die im Filter-Tube befindliche cDNA noch zweimal mit 500 bzw. 200 µl Waschpuffer bei 13000 rpm für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das abschließende Eluieren der cDNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl H₂O und 1minütiger Zentrifugation in einem neuen Eppendorfgefäß.

Die aufgereinigte cDNA konnte nun in einem weiteren Schritt für die Sequenzierreaktion präpariert werden.

Die für die Sequenzierreaktion notwendige zweite PCR und die nachfolgende Reinigung wurden mittels des dye terminator Kits (*Amersham*) durchgeführt. In einem 20 µl Ansatz wurden 8 µl DYEnamic ET terminator reagent premix, 5 µM Primer sowie 11 µl cDNA gemischt. Die PCR erfolgte nach festgelegten Bedingungen: Denaturierung bei 96°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 40 s, Elongation bei 60°C für 2 min, 30 Zyklen.

Nach Beendigung der Reaktion wurden zur Fällung zu dem cDNA-Mix 2 µl einer 7,5 M NaAc-Lösung sowie 50 µl 100 %iges Ethanol pipettiert, die Lösung bei 4600 rpm für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem weiteren Reinigungsschritt wurde das Sediment in 150 µl 70 %igem Ethanol aufgenommen, kräftig gemischt und zur erneuten Sedimentation 10min bei 4600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Ethanol-

Überstand wurde restlos abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und letztendlich in 10 μ l Loading solution resuspendiert.

3.2.8 Sequenzierreaktion

Die Ermittlung der Sequenz des spezifischen PEDF-cDNA-Fragmentes erfolgte durch kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation mittels der Didesoxymethode nach Sanger.

Nach dieser Methode enthält das Inkubationsgemisch neben der spezifischen cDNA, der DNA-Polymerase, den Primern und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten zusätzlich fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyanaloge der vier Nukleotide, wobei jedes dieser vier Analoga Licht in einem anderen Bereich emittiert. Wie bei einer normalen Replikation erfolgt die Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase komplementär zum Matrizenstrang. Der Einbau eines Analogons blockiert wegen Fehlens des 3'-Hydroxylendes das weitere Wachstum der Kette und führt zur Bildung unterschiedlich großer Fragmente. Die aufgrund der hohen Replikationsrate entstehenden Pools von Abbruchfragmenten jeder Länge werden anschließend nach ihrer Molekülgröße in zylindrischen Gelen mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Detektion der aufgetrennten Fragmente erfolgt anhand der Fluoreszenzmarkierung des Didesoxyanalogons am 3'-Ende unmittelbar nach dem Austreten aus dem Gel. Die Zuordnung des entsprechenden Didesoxynukleotides zum gemessenen Emissionsbereich ermöglicht die Ermittlung der folgerichtigen Sequenz des spezifischen Fragmentes.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion

Alle Schritte der Proteinisolation erfolgten auf Eis. 8×10^5 Zellen/ml wurden mit 250 μ l Lysepuffer versetzt, mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Zur vollständigen Lyse wurde die Zellsuspension 2 x 5 s auf hoher Stufe gevortext. In

der darauffolgenden 10-minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C erfolgte die Sedimentation der Zellfragmente. Der Überstand mit dem gelösten Protein wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

Lysepuffer

0,5% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS

Proteasen-Mix: 1mM PMSF in DMSO gelöst

0,05% (w/v) bzw. 0,5 µg/ml Leupeptin

0,1% (w/v) bzw. 1 µg/ml Aprotinin

3.3.2 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten sowie Zellüberständen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in einem 8 x 8 cm Polyacrylamid-Gel nach Laemmli [100], bestehend aus einem 10%igen (w/v) Trenngel und einem darüber gelegenen 5 %igen (w/v) Sammelgel. Das Trenngel wurde in eine 75 mm Hoefer-Kammer bis 3 cm unterhalb der oberen Kante pipettiert. Das Gel wurde vorsichtig mit 300 µl wassergesättigtem Butanol bedeckt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Butanol entfernt, das Trenngel mit Sammelgel überschichtet und vorsichtig der Gelkamm eingesetzt.

Zur Probenvorbereitung wurden 21 µl der auf Eis gelagerten Proteinlösungen mit 7µl Proteinprobenpuffer versetzt. Die Probelösungen wurden bei 95°C 4 min denaturiert. Die Denaturierung ermöglichte in Anwesenheit von SDS und DTT die Trennung nicht-kovalenter Bindungen zwischen den Polypeptidketten und die Bindung der im Puffer enthaltenen SDS-Anionen an die Proteinketten unter Bildung elektrophoretisch sehr mobiler SDS-Protein-Komplexe. Durch die entstandene stark negative Ladung, die ungefähr proportional zur Masse des Proteins ist, wanderten die Proteine im elektrischen Feld und wurden nach Molekulargewicht aufgetrennt. Als Referenz diente eine Probe aus humanem Glaskörper. Zur genauen Bestimmung des Molekulargewichtes wurde eine biotinylierte Molekulargewicht-Proteinleiter (Cell Signalling Technology) verwendet. Die polymerisierten Gele wurden in der Elektrophoresekammer plziert, der Kamm entfernt und die Kammer mit 1x Protein-Laufpuffer aufgefüllt. Die Geltaschen wurden anschließend mit 5 µl Marker und 15 µl der Proben befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Moleküle erfolgte bei 100 V für etwa 2h.

Acrylamid-Stammlösung

29,2 % (w/v) Acrylamid

0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Lower Tris (pH 8,8):

18,7 % (w/v) Tris Base

Upper Tris (pH 6,8):

6,06 % (w/v) Tris Base

Proteinproben-Puffer (4x):

200 mM Tris-HCl, pH 6,8

400 mM DTT

8 % (w/v) SDS

40 % (v/v) Glycerin ad

0,4 % (w/v) Pyronin Y

Proteingel-Laufpuffer (10x):

72 g Glycin

15 g Tris Base

5 g SDS

500 ml Reinstwasser

Sammelgel 5%

63 mM upper Tris (pH 6)

5% (v/v) Acrylamidstammlösung (30%ig)

0,1% (w/v) SDS

0,1% (w/v) APS

0,1% (v/v) TEMED

Trenngel 10%

375mM lower Tris

10% (v/v) Acrylamidstammlösung (30%ig)

1% (w/v) SDS

1% (w/v) APS

0,07% (v/v) TEMED

3.3.3 Semitrockener Proteintransfer

Der Transfer der Proteine nach der Elektrophorese aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte in einem halbtrockenen Verfahren. Nach Abtrennung des Sammelgels wurde das Trenngel mit einem trockenen, 3mm dicken Whatman Papier von der Rückseite des Gelsystems gelöst, in Kathodenpuffer getränkt und luftblasenfrei auf fünf Lagen in Kathodenpuffer getränktes Whatman Papier gelegt, das sich auf einer Graphitplatte als Kathode befand. Die PVDF-Membran wurde durch eine 5 s dauernde Methanolbehandlung aktiviert, gewässert und anschließend kurz in Anodenpuffer 2 getaucht. Danach wurde das Trenngel damit abgedeckt. Schließlich wurde der Transferaufbau durch Beschichtung mit vier Lagen in Anodenpuffer 2 und zwei Lagen in Anodenpuffer 1 getränkte Whatman Papiere sowie Auflage einer zweiten Graphitplatte als Anode vervollständigt. Das Blotten erfolgte 45 min bei 100mA und 20 V. Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen wurde 30 min mit Waschpuffer inkubiert, um aktive Komponenten der Membran zu blockieren und unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

Kathodenpuffer

100 mM L-Arginin

Anodenpuffer 1

300 mM Tris Base

20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer 2

20mM Tris Base

20% (v/v) Methanol

Waschpuffer

5% (w/v) fettarmes Milchpulver in TBS/T

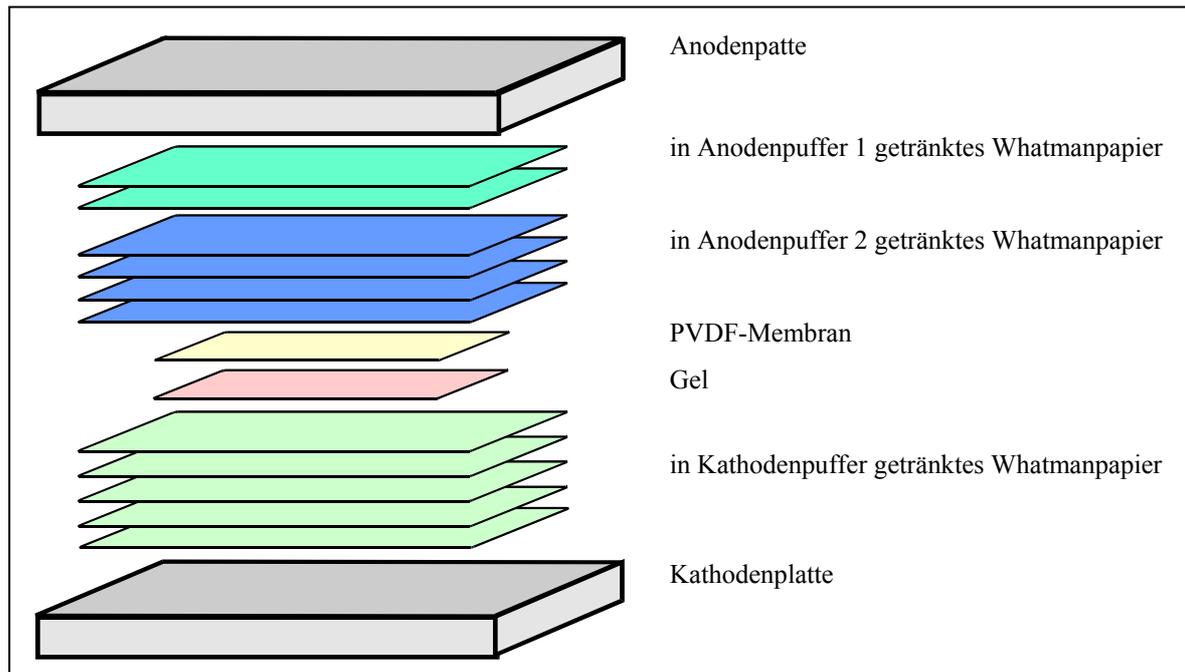


Abb. 3.2: Aufbau des semitrockenen Proteintransfers

3.3.4 Immunblot

Die Membran wurde zweimal mit TBS/T gespült und für 1 h bei Raumtemperatur mit Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit dem Primärantikörper abgenommen und die Membran zur Entfernung ungebundener Antikörper zweimal mit TBS/T gespült, einmal für 15 min und dreimal für 5 min gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem 1:5000 in TBS/T verdünnten Sekundärantikörper, einem gegen den konstanten Fc-Teil des primären Antikörpers gerichteten und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Immunglobulin, für eine weitere Stunde bei RT. Während die Proteinproben mit dem Zweitantikörper inkubiert waren, wurde die biotinylierte Proteinleiter separat mit 1:1000 verdünntem HRP-gekoppeltem anti-Biotin-AK inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut zweimal mit TBS/T gespült, einmal für 15 min und dreimal für 5 min gewaschen. Das Sichtbarmachen der Immunreaktion erfolgte mittels Detektions-Reagenz. Dazu wurde die Membran für 1 min mit einem Gemisch aus Lumineszenz-Reagenz und Peroxid im Verhältnis 1:1 überschichtet, die Lösung abgenommen und die feuchte Membran luftblasenfrei in Folie verpackt. Unter Komplexbildung mit dem Substrat Wasserstoffperoxid oxidiert die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase das im Gemisch enthaltene Luminol. Die durch diese

Reaktion freigesetzte Energie in Form von Lichtquanten (Chemilumineszenz) konnte mittels des Fuji Gel Imagers sichtbar gemacht werden.

3.3.5 Insulin-ELISA

Für die Messung der Insulinsekretion der INS-1 Zellen wurde das Rat Insulin ELISA Kit (*Crystal Chem*) verwendet.

Zunächst erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe (2500, 1250, 625, 313, 156, 78 39 pg/ml Insulin) der Insulin-Stammlösung als Standard. In 96-Well-Platten, in denen bereits monoklonale Anti-Insulin-Antikörper am Boden gebunden waren, wurden jeweils 50µl Probe bzw. Standard aus der Verdünnungsreihe gegeben und dazu 50µl Guinea Pig Anti-Insulin-Antikörper hinzugefügt. Danach folgte die Inkubation für 16 h bei 4°C. Dann wurde der Überstand verworfen und die Wells mit je 300µl Waschpuffer gewaschen.

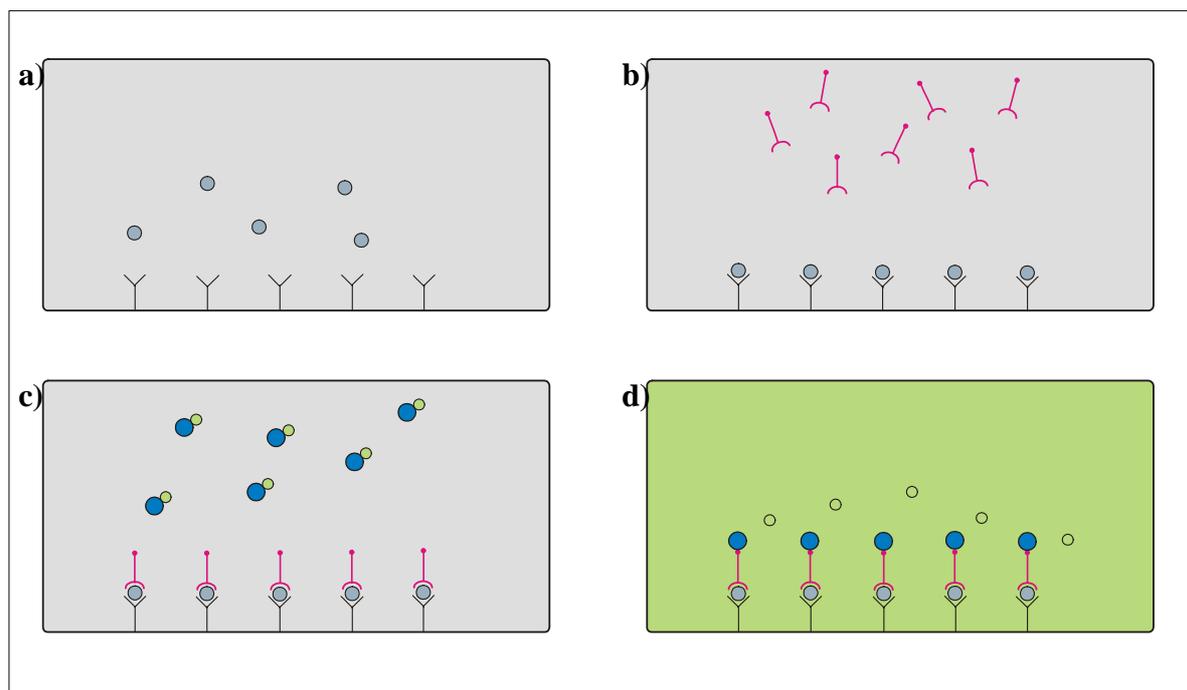


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Insulin-ELISA

Das in den Proben und den Standardlösungen vorhandene Insulin wird an den am Boden der Wells befindlichen Anti-Insulin-Antikörper gebunden. (a) Der Guinea Pig Anti-Insulin-Zweit-Antikörper bindet an das immobilisierte Insulin. (b) Das Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate bindet an den Zweit-Antikörper. (c) Durch Zugabe der Enzyme Substrate Solution kommt es zu einer enzymatischen Reaktion mit Farbentwicklung, die schließlich im Spectrophotometer gemessen werden kann. (d)

Nach Zugabe von 100µl Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate wurde die Platte für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte das erneute Waschen mit 300µl Waschpuffer. Anschließend wurden 100 µl Enzyme Substrate Solution hinzugegeben und unter Vermeidung von Lichtexposition 30 min inkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50µl Enzyme Reaction Stopping Solution gestoppt.

Abschließend konnte durch Messung der Absorption mit dem Spectralphotometer bei 492nm die Insulinkonzentration anhand der Verdünnungsreihe berechnet werden.

3.4 Statistische Methoden

Bei Bildung von Mittelwerten ist deren Vertrauensbereich als Standardfehler des Mittelwertes (SEM = ‚standard error of the mean‘) angegeben.

Die Unsicherheitswahrscheinlichkeit p wurde mittels T-Test berechnet. Als signifikant wurden Hypothesen mit einer Unsicherheitswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von PEDF in INS-1 Zellen

4.1.1 Expression von PEDF mRNA in INS-1 Zellen

Mit Hilfe einer PCR konnte nachgewiesen werden, dass die INS-1 Zellen selbst PEDF exprimieren. Das Vorkommen eines PEDF-Transkripts konnte bereits in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen werden [68]. Nach Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen konnte das spezifische PEDF-Fragment auch in der hier untersuchten β -Zell-Linie amplifiziert werden. Um eine Kontamination und Interferenz mit einer möglichen co-extrahierten DNA zu vermeiden, wurde zusätzlich vor der Reversen Transkription eine Behandlung der RNA mit DNase durchgeführt [101]. Es zeigte sich sowohl in der originären PCR als auch nach Verdauung mit DNase eine spezifische Bande entsprechend des amplifizierten PEDF-Fragmentes der Länge 144bp.

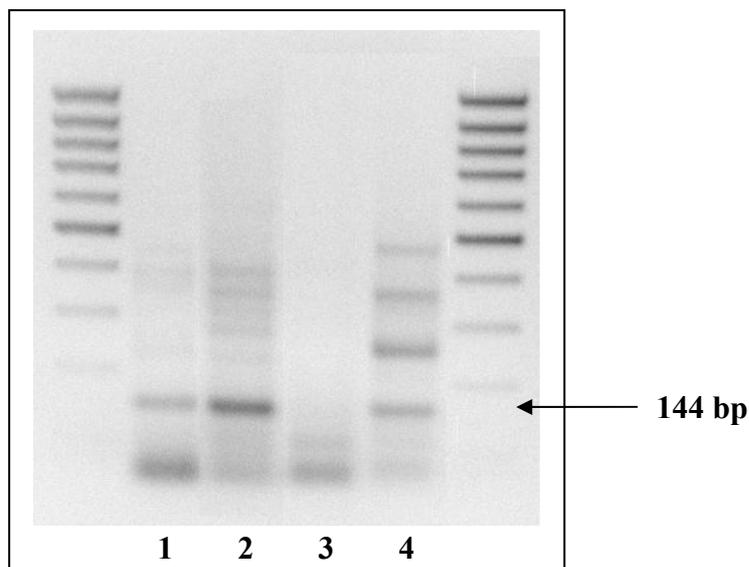


Abb. 4.1: Darstellung des aus 144 Basenpaaren bestehenden PEDF-cDNA-Fragmentes nach Auftrennung in einer 1%igen Agarose-Gelmatrix. In den Spuren 1 und 2 sind Banden zu erkennen, die dem PCR-Produkt von PEDF entsprechen. Spur 1 zeigt dabei das Ergebnis nach zusätzlicher DNase-Verdauung. In Spur 3 wurde RNA ohne Durchführung einer Reversen Transkription als Negativkontrolle verwendet. Spur 4 stellt die Positivkontrolle aus RPE-Zellen dar.

Bei einer anschließenden Sequenzierung konnte die Übereinstimmung der Basensequenz und damit der Nachweis von PEDF bestätigt werden.

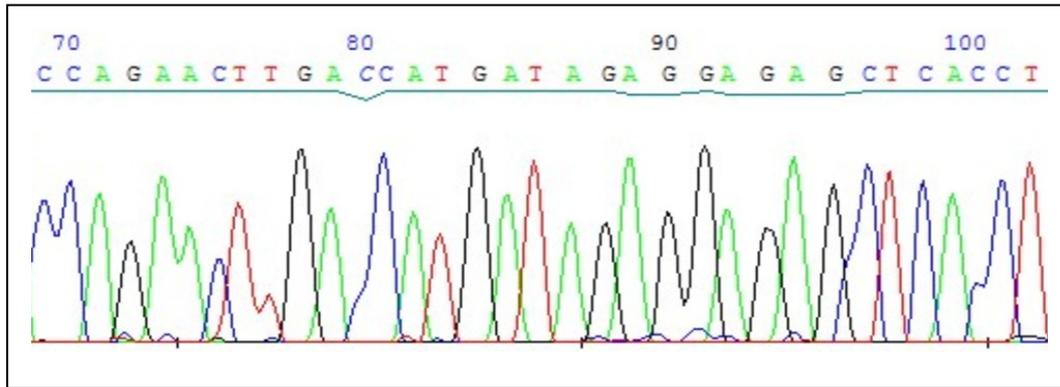


Abb. 4.2: Ausschnitt aus der Sequenz der analysierten PEDF-mRNA. Gezeigt ist ein Abschnitt mit den Basen 69 bis 102

4.1.2 Nachweis von PEDF auf Proteinebene

Von primären RPE-Zellen ist bekannt, dass PEDF auf Proteinebene exprimiert und ausgeschüttet wird [102]. Darauf basierend wurde die PEDF-Proteinexpression in INS-1 Zellen untersucht. Hierzu wurden nach Kultivierung der INS-1 Zellen Zellüberstände sowie Zelllysate mittels Western blot analysiert. Als Positiv-Kontrolle diente dabei humane Glaskörperflüssigkeit [103]. Der Nachweis von PEDF als Protein in INS-1 Zellen gelang nicht. Weder im Zellüberstand noch im Lysat der INS-1 Zellen konnte PEDF als Protein nachgewiesen werden.

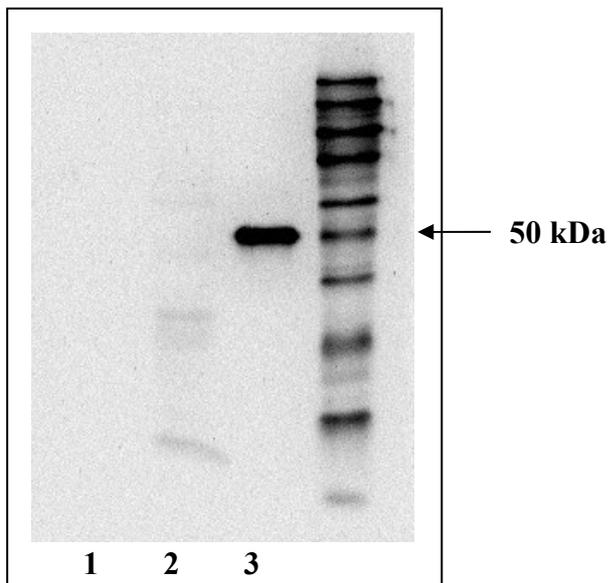


Abb. 4.3: Detektion von PEDF im Western blot. In den Proben der INS-1 Zellen zeigte sich keine spezifische Bande. In Spur 1 wurde dabei der Zellüberstand der INS-1 Zellen verwendet, Spur 2 stellt das Ergebnis aus dem Zelllysate dar. In der Glaskörperflüssigkeit als Positivkontrolle (Spur 3) wurde das 50kDa Protein PEDF dagegen exprimiert.

4.2 In vitro-Studien

4.2.1 Zytotoxischer und oxidativer Stress in INS-1 Zellen sowie deren Beeinflussung durch PEDF

Proinflammatorische Zytokine und oxidativer Stress sind an der Entstehung von Diabetes mellitus beteiligt [104, 105, 106, 107]. Es sollte hier die Beeinflussung der β -Zell-Funktion durch proinflammatorische Zytokine und oxidativen Stress sowie die mögliche Wirkung von PEDF auf diese Prozesse untersucht werden.

Zur Untersuchung des Einflusses proinflammatorischer Zytokine wurde mit dem MTS-Assay die Stoffwechselaktivität der INS-1 Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1 β sowie in Kombination mit TNF- α gemessen.

Die Inkubation mit niedriger Konzentration von IL-1 β (50pg/ml) erbrachte nur eine minimale Reduktion der Stoffwechselaktivität bzw. der Zellzahl um 3% [96,6 \pm 2,68%, p=0,34]. Bei 150pg/ml und 1500pg/ml IL-1 β zeigte sich dagegen eine deutlich signifikante Minderung um 16% [83,7 \pm 0,10%, p=0,00035] bzw. 21% [78,7 \pm 0,45%, p=0,00045]. Unter gleichzeitiger Stimulation mit 1500pg/ml IL-1 β und 10ng/ml TNF- α war der stärkste Effekt mit einer Verringerung der Zellzahl um 24% [76,1 \pm 1,33%, p=0,0031] zu verzeichnen.

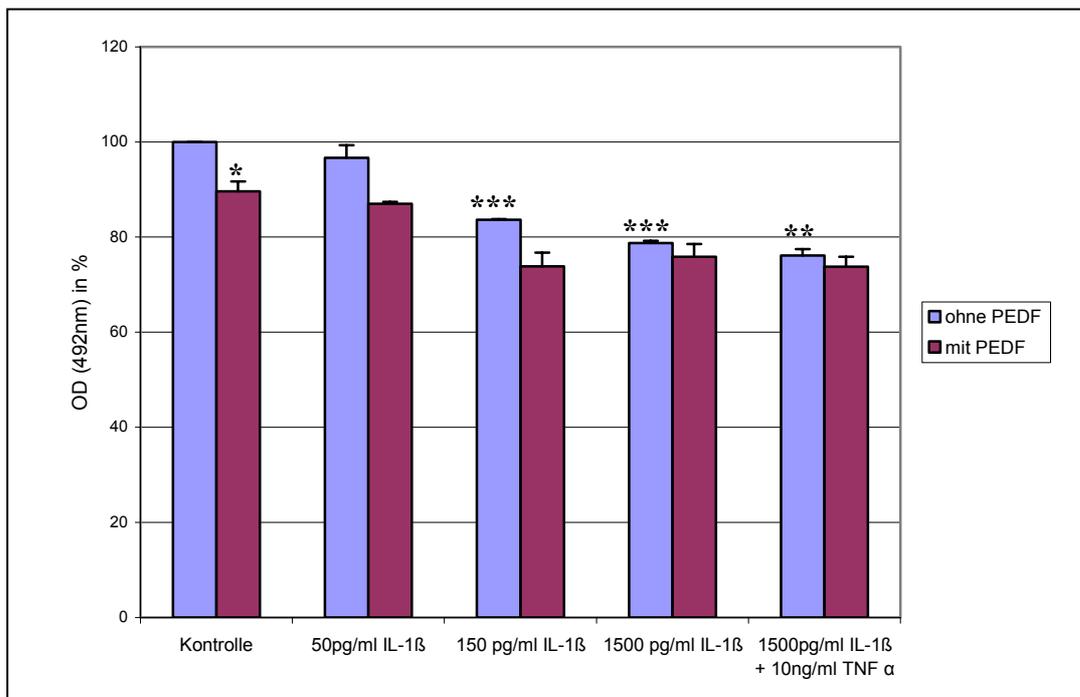


Abb. 4.4: Inhibition der metabolischen Aktivität durch proinflammatorische Zytokine und deren Beeinflussung durch PEDF (20nM) in INS-1 Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte die Messung mittels MTS-Assay, um die metabolische Aktivität zu bestimmen und Rückschluss auf die Zellzahl zu ziehen. (Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Durch Inkubation mit PEDF ließ sich eine geringe Reduktion der Stoffwechselaktivität bzw. Zellzahl erzielen. Diese war allerdings nur in der Kontrolle ohne zusätzliche Stimulation mit IL-1 β signifikant. Hier war eine Reduktion um 10% [89,6 \pm 2,07%, p=0,038] nachweisbar. Während bei niedrigerer Konzentration IL-1 β von 50pg/ml und 150pg/ml eine vergleichbare Veränderung mit 10% [90,2 \pm 2,84%, p=0,074] bzw. 12% [88,2 \pm 3,36%, p=0,073] feststellbar war, betrug die Minderung bei 1500pg/ml IL-1 β und bei Kombination von 1500pg/ml IL-1 β mit 10ng/ml TNF- α nur noch 4% [96,3 \pm 3,28%, p=0,37] bzw. 3% [97,1 \pm 4,47%, p=0,60].

In der IL-1 β -Konzentrationsreihe zeigte sich ebenfalls eine Dosisabhängigkeit der Zytokin-induzierten Minderung der Zellzahl. Ab einer Konzentration von 250pg/ml war eine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität nachweisbar. Die maximale Minderung um 24% war ab einer Konzentration von 1000pg/ml IL-1 β erreicht. Ein Effekt durch PEDF war nicht nachweisbar. Es fanden sich lediglich geringe, nicht signifikante Veränderungen der Stoffwechselaktivität um bis zu 5%.

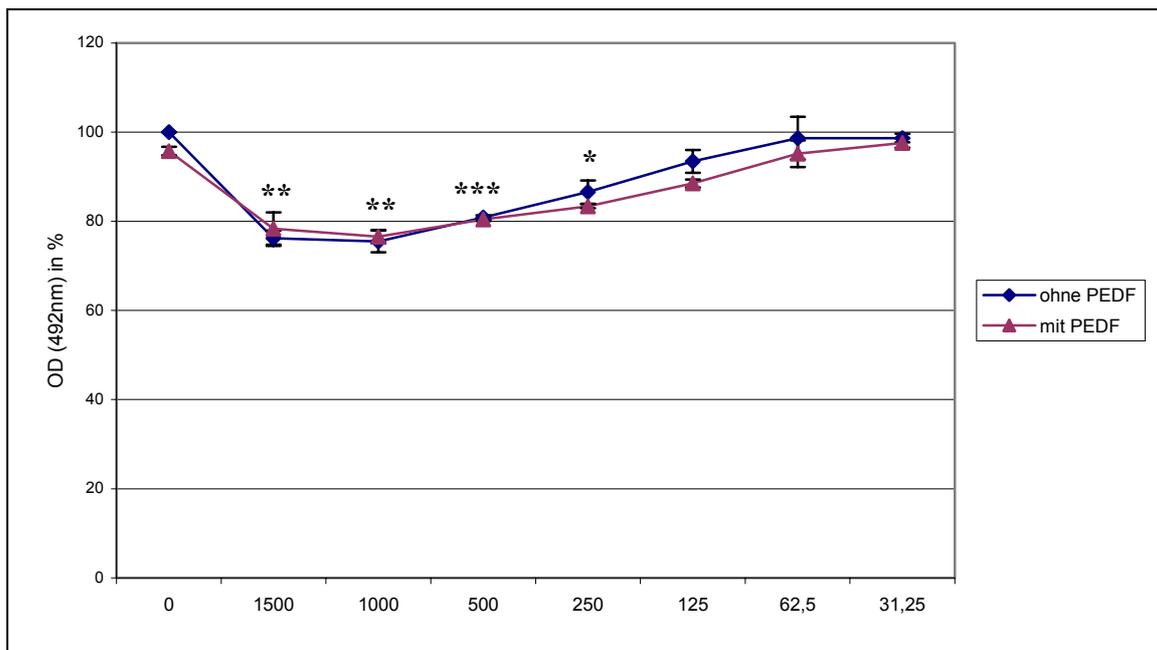


Abb. 4.5: Konzentrationsreihe der proinflammatorischen Zytokine und der Einfluss von PEDF (20nM) in INS-1 Zellen. Die Inkubation erfolgte mit Konzentrationen IL-1 β von 31,25 bis 1500pg/ml. (Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit einer PEDF-Wirkung zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0 – 40 nM PEDF

durchgeführt. Es zeigten sich bei allen PEDF-Konzentrationen keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Der vorher ermittelte Effekt der Zytokine konnte bestätigt werden.

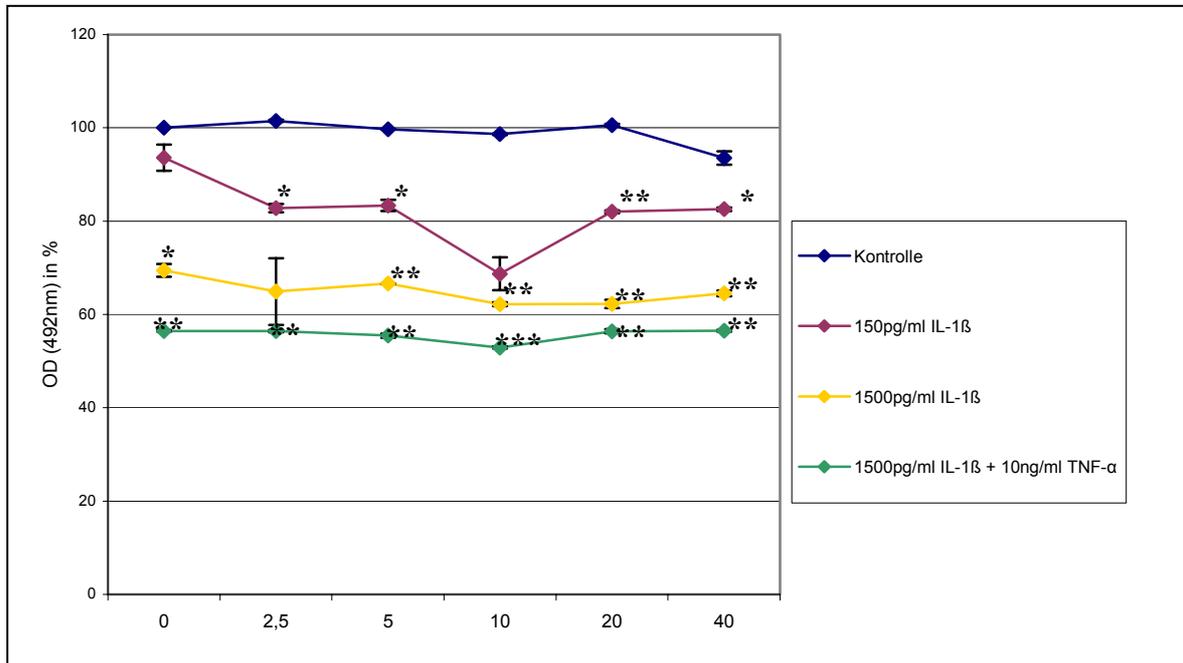


Abb. 4.6: Konzentrationsreihe zur Bestimmung des Einflusses von PEDF (20nM) auf die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine in INS-1 Zellen.

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

Als Modell zur Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf die β -Zell-Funktion wurde die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 gewählt. Um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten und eine BSA-Wirkung auszuschließen, wurde den Ansätzen ohne H_2O_2 1%iges BSA hinzugefügt. Signifikante Verringerungen der Stoffwechselaktivität waren bei Konzentrationen von 1mM sowie 0,5mM H_2O_2 zu verzeichnen. Es fanden sich Minderungen um 30% [69,9±0,41%, p=0,00019] bzw. 26% [73,6±0,42%, p=0,00026]. Bei Inkubation mit 0,1mM H_2O_2 war keine Verringerung der Zellzahl darstellbar. Die zusätzliche Gabe von PEDF sorgte, analog zu den Versuchen mit den Zytokinen, in allen Proben, sowohl in den Ansätzen mit H_2O_2 als auch in der Kontrolle, für eine Minderung der Zellzahl. In der Kontrolle zeigte sich eine verringerte Stoffwechselaktivität gegenüber den Proben ohne PEDF um 10% [89,6±2,07%, p=0,038]. Auch bei 0,1 und 0,5mM H_2O_2 war eine signifikante Reduktion um 13% [86,6±2,69%, p=0,038] und 5% [95,45±0,19%, p=0,017] festzustellen. Bei hoher Konzentration von 1mM H_2O_2 war nur eine geringe Minderung um 4% [96,1±2,05%, p=0,19] sichtbar.

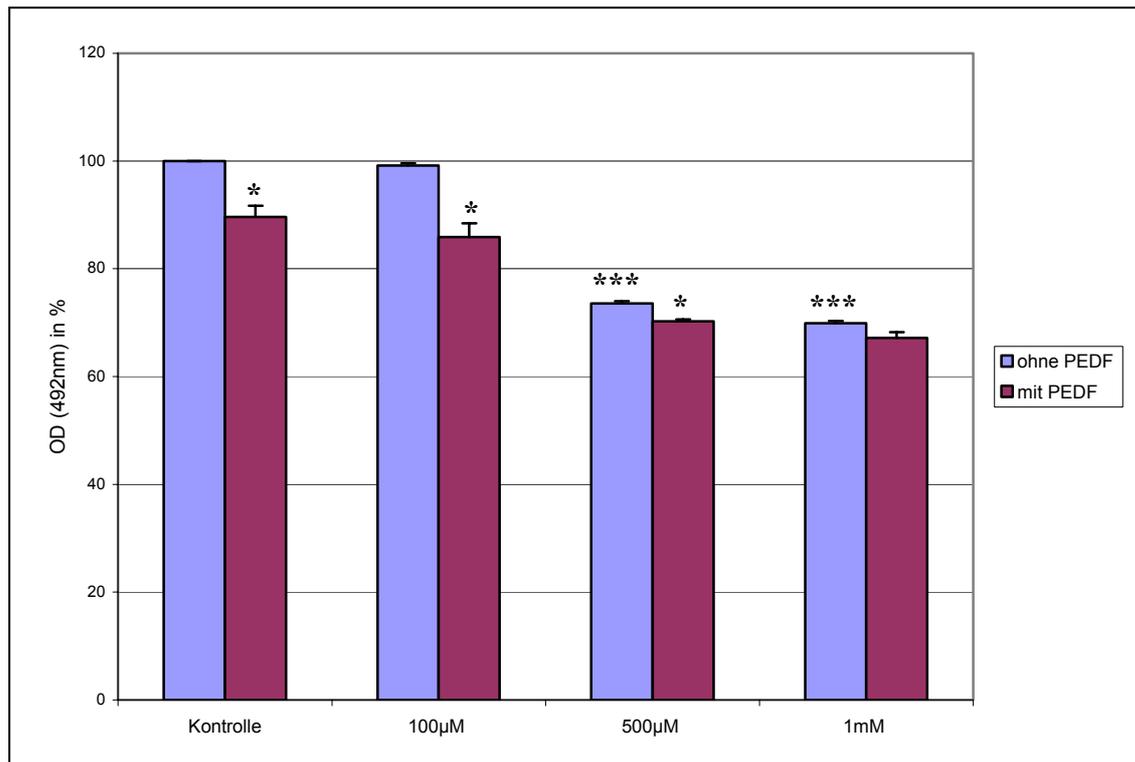


Abb. 4.7: Inhibition der metabolischen Aktivität durch oxidativen Stress und deren Beeinflussung durch PEDF (20nM) in INS-1 Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ erfolgte die Messung mittels MTS-Assay. (Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05, *** p<0,001)

4.2.2 Einfluss von Glukose und PEDF auf die Proliferation der INS-1 Zellen

Die β -Zell-Proliferation kann durch verschiedene Nährstoffe und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Von INS-1 Zellen ist bekannt, dass Glukose die β -Zell-Proliferation stimuliert [108]. Die INS-1 Zellen wurden analog zu den nachfolgend beschriebenen Versuchen zur Bestimmung der Insulinexpression bei 3mM, 16,5mM Glukose sowie 3mM Glukose mit 13,5mM Mannitol inkubiert. Nach 96 Stunden war eine glukoseabhängige Wachstumssteigerung um 77% [177,5 \pm 11,80%, p=0,096] zu verzeichnen.

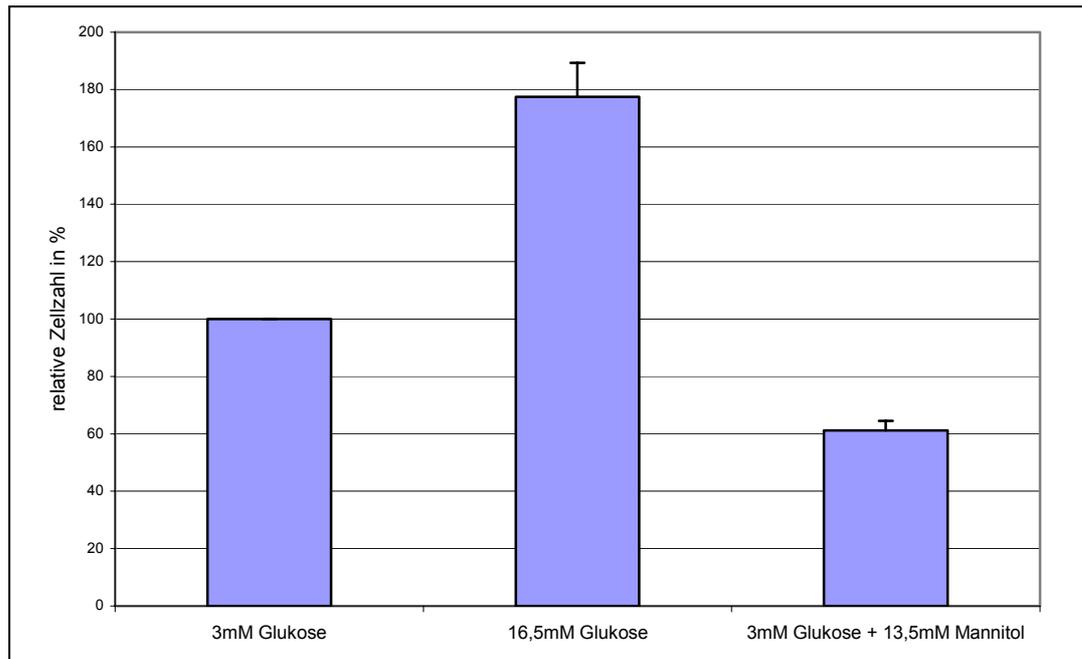


Abb. 4.8: Wirkung von Glukose auf die Proliferation der INS-1 Zellen.
(Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05)

PEDF besitzt eine proliferationshemmende Wirkung auf verschiedene Zelllinien [109]. Zur Ermittlung des Einflusses von PEDF auf die Proliferation der INS-1 Zellen wurden diese mit 40nM PEDF inkubiert und anschließend mittels MTS-Assay sowie Zellzählung im Hämocytometer analysiert. In beiden Versuchsreihen konnte eine Hemmung der Proliferation durch PEDF festgestellt werden. Fanden sich nach 96 h noch keine Unterschiede zwischen den mit PEDF inkubierten und den unbehandelten Zellen, war nach längerer Inkubation unter PEDF eine Minderung der β -Zell-Proliferation messbar.

Die Messung mittels MTS-Assay erbrachte nach 96 h eine geringe, nicht signifikante Minderung der Proliferation unter dem Einfluss von PEDF um 7% [$93,3 \pm 4,03\%$, $p=0,24$]. In den nächsten Messungen war die Hemmung des Wachstums dann deutlicher. Nach 120 h war bereits eine Proliferationshemmung um 27% [$72,8 \pm 7,04\%$, $p=0,061$] feststellbar. Nach 144 h und 168 h bewirkte PEDF schließlich eine signifikante Verringerung der Proliferation um 37% [$63,4 \pm 6,45\%$, $p=0,030$] bzw. 41% [$58,8 \pm 3,88\%$, $p=0,0088$].

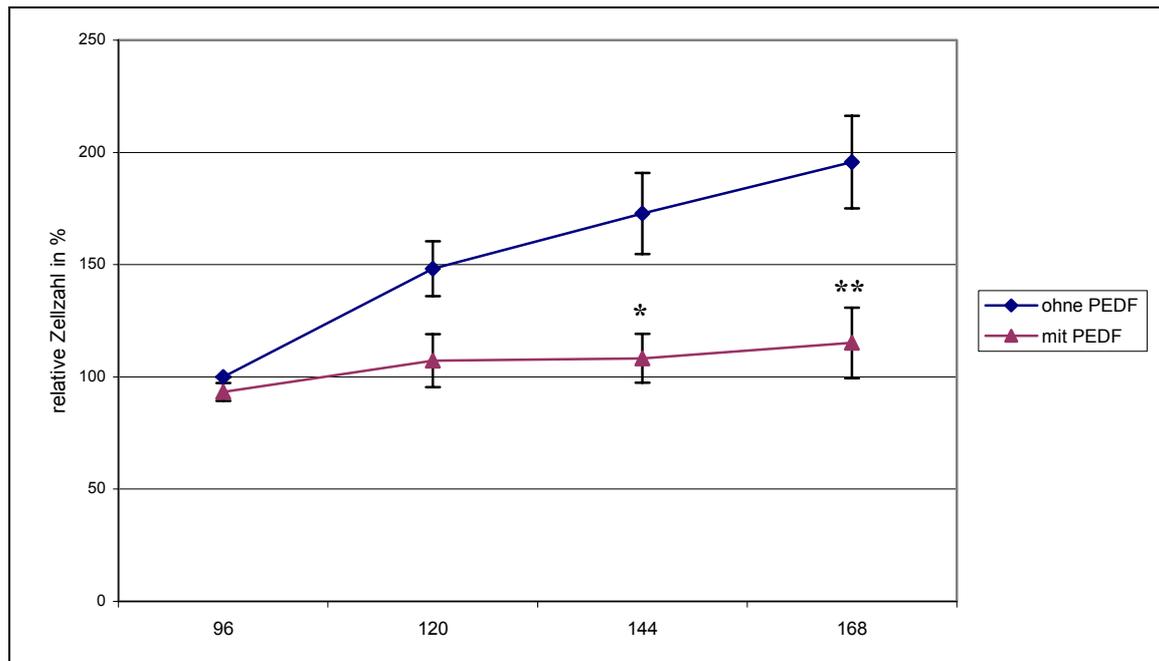


Abb. 4.9: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Proliferation der INS-1 Zellen. (I) Nach Aussaat einer definierten Anzahl INS-1 Zellen erfolgte nach 96, 120, 144 und 168 Stunden die Bestimmung der Zellzahl mittels MTS-Assay.

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

Bei den Versuchen mit Zellzählung im Hämocytometer zeigten sich vergleichbar geringere Minderungen der Proliferation durch PEDF. Nach 120 h war eine signifikante Wachstumshemmung um 17% [83,0±0,57%, p=0,030] nachzuweisen. Nach 144 h und 168 h steigerten sich diese Unterschiede nur sehr gering. Es konnten Verringerungen der Proliferation um jeweils ca. 19% [81,3±0,23%, p=0,011] bzw. [80,6±0,01%, p=0,0004] verzeichnet werden.

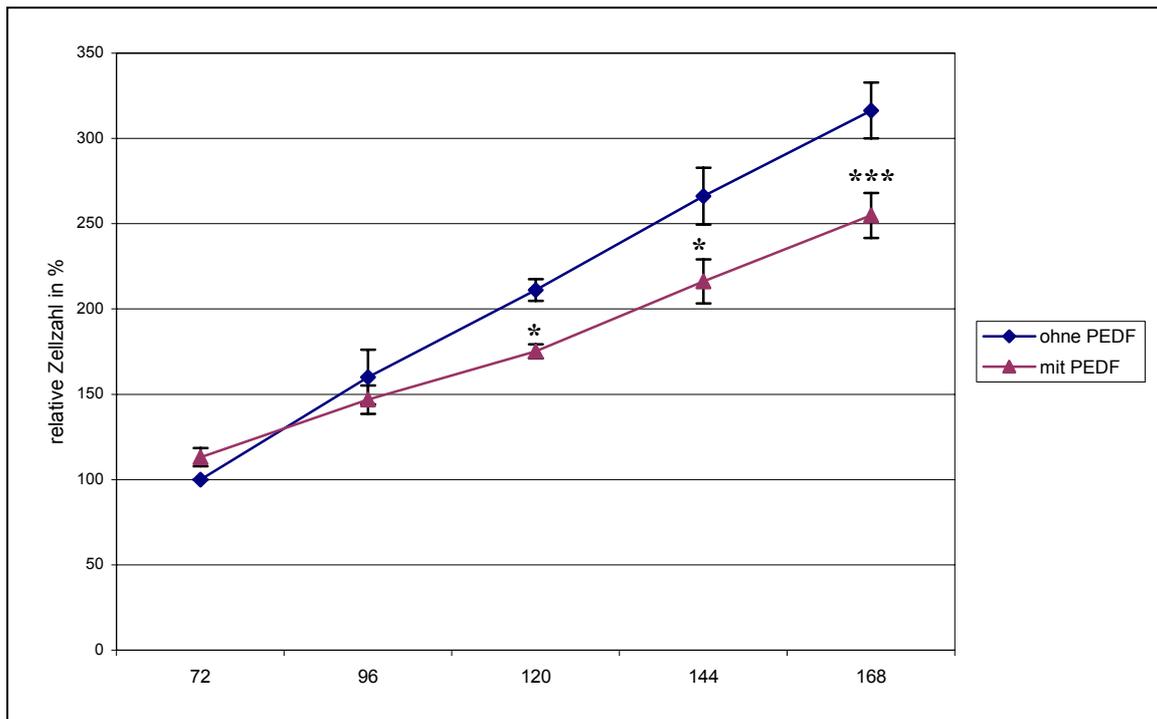


Abb. 4.10: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Proliferation der INS-1 Zellen. (II) Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden mittels Zellzählung im Hämocytometer. (Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05, *** p<0,001)

4.2.3 Insulinexpression in INS-1 Zellen

4.2.3.1 Einfluss von Glukose auf die mRNA Expression von Insulin

Eine große Anzahl von Faktoren hat einen Effekt auf die Insulinsynthese in der β -Zelle. Chronische Exposition von supraphysiologischer Glukosekonzentration führt zur Verringerung der Insulinexpression [110, 111], ein Vorgang der auch als Glukosetoxizität bezeichnet wird.

Es sollte daher hier untersucht werden, welchen Einfluss eine erhöhte Glukosekonzentration auf die mRNA Expression von Insulin hat. Dazu wurden INS-1 Zellen für 48 Stunden mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen stimuliert. Eine niedrige Konzentration von 3mM, eine höhere Konzentration von 16,5mM sowie ein osmotisch identischer Inkubationsansatz mit 3mM Glukose + 13,5 mM Mannitol wurden in ihrer Wirkung auf die Insulinexpression miteinander verglichen. Die bei 16,5mM Glukose inkubierten Zellen zeigten dabei eine um über 80% [16,1 \pm 8,8%, p=0,011] verringerte Insulinexpression gegenüber den mit niedriger Glukose stimulierten Zellen. Unter Zugabe von Mannitol zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Insulinexpression um 35% [135,0 \pm 31,6%, p=0,38].

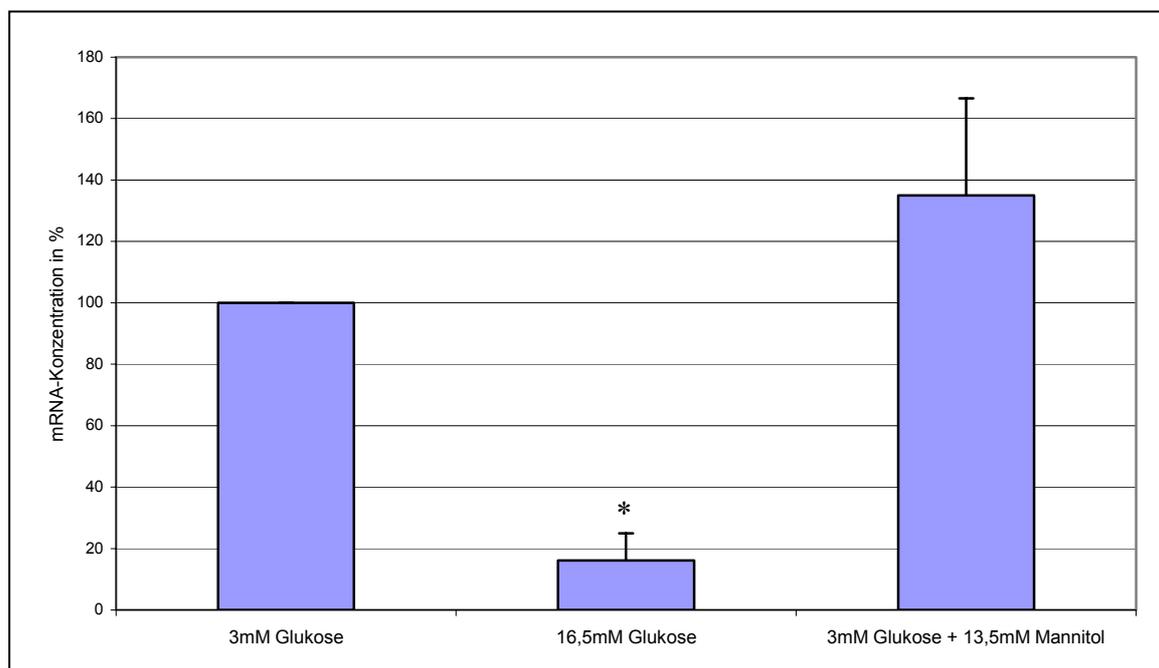


Abb. 4.11: Wirkung chronischer Hyperglykämie auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen.
(Anzahl der Versuche: n=3; * p<0,05)

4.2.3.2 Einfluss von PEDF auf die mRNA Expression von Insulin

Zur Ermittlung des Einflusses von PEDF auf die Insulin Genexpression wurde die gleiche Versuchsanordnung unter zusätzlicher Gabe von 40nM PEDF durchgeführt.

Auch hier fand sich ein Abfall der Insulinexpression bei höherer Glukose um etwa 80% [$17,0 \pm 7,5\%$, $p=0,008$]. Im Vergleich zu den Kontrollwerten ohne PEDF zeigten sich unter Stimulation mit PEDF geringe, jedoch nicht signifikante Anstiege. Bei niedriger Glukosekonzentration war eine nicht-signifikante Steigerung um 15% [$114,8 \pm 19,1\%$, $p=0,52$] und bei hoher Glukose ein Anstieg um 16% [$116,1 \pm 28,7\%$, $p=0,39$] zu verzeichnen.

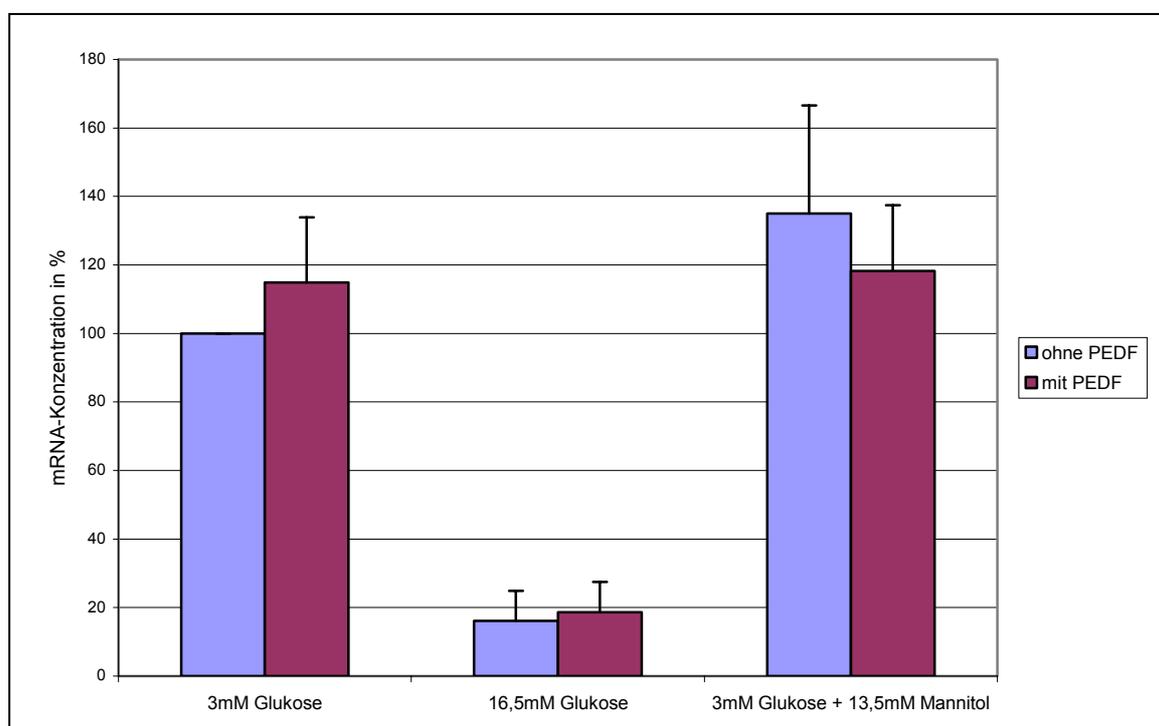


Abb. 4.12: Wirkung von PEDF auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen. Die Insulinexpression bei Stimulation mit PEDF (40nM) für 48 Stunden wurde sowohl bei physiologischer als auch supraphysiologischer Glukosekonzentration im Medium mit Proben ohne PEDF-Stimulation verglichen. (Anzahl der Versuche: $n=3$; * $p<0,05$)

Um eine mögliche Zeitabhängigkeit eines PEDF-induzierten Effekts zu untersuchen, wurde eine Wiederholung des Versuches mit einer verlängerten Inkubationszeit von 120 Stunden vorgenommen. Es fanden sich ebenfalls, sowohl ohne als auch mit PEDF, Verringerungen der Insulinexpression bei hoher Glukose um über 80% [ohne PEDF: $12,5 \pm 1,16\%$, $p=0,008$; mit

PEDF: $13,1 \pm 2,6\%$, $p=0,019$]. Die relative mRNA-Menge bei niedriger Glukose mit PEDF wies im Vergleich zur Stimulation ohne PEDF eine nicht signifikante Erhöhung um 45% [$145,4 \pm 42,2\%$, $p=0,48$] auf. Bei hoher Glukose war jedoch eine signifikante Steigerung der Insulinexpression um 44% [$143,7 \pm 1,1\%$, $p=0,016$] feststellbar.

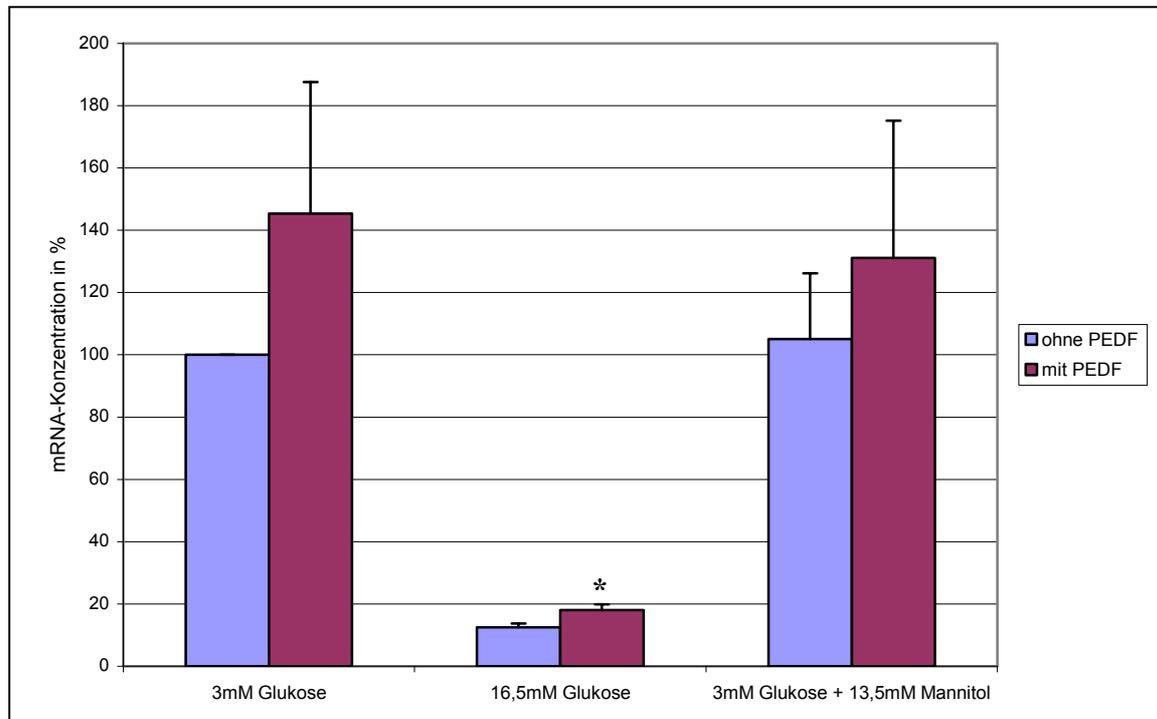


Abb. 4.13: Chronische Wirkung von PEDF auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen. Nach Inkubation über 120 Stunden erfolgte die Bestimmung der Insulinexpression mit und ohne Stimulation mit PEDF (40nM).

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

Dieser Trend konnte durch weitere Versuche mit kommerziell verfügbarem rekombinanten PEDF und einer Inkubationszeit von 48 Stunden bestätigt werden. Sowohl bei niedriger als auch bei hoher Glukosekonzentration im Medium zeigte sich bei Zugabe von PEDF ein Anstieg der Insulinexpression. Bei hoher Glukose fand sich eine Steigerung der Insulinexpression um mehr als 200% [$318,1 \pm 119,5\%$, $p=0,32$], allerdings nicht signifikant. Geringere Anstiege um 59% [$159,0 \pm 95,3\%$, $p=0,65$] und 89% [$189,2 \pm 112,2\%$, $p=0,57$] waren bei niedriger Glukose bzw. der Kontrolle mit Mannitol zu verzeichnen.

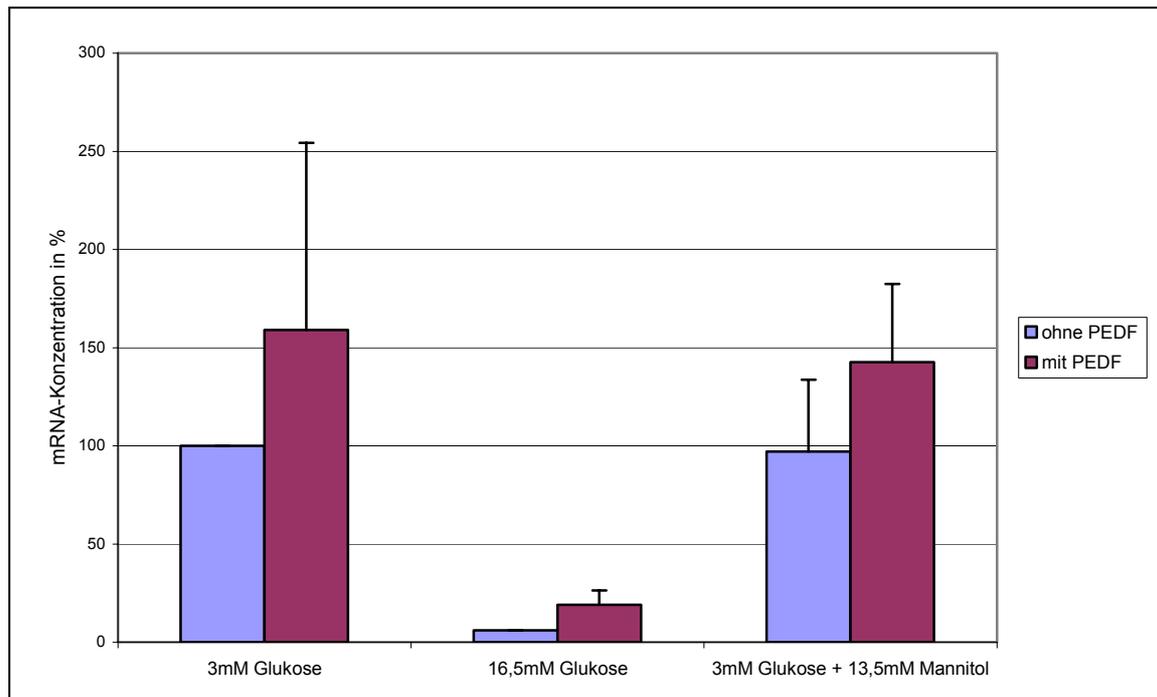


Abb. 4.14: Wirkung von kommerziell erworbenem PEDF (40nM) auf die Insulinexpression der INS-1 Zellen.

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

4.2.4 Beeinflussung der Insulinsekretion durch Glukose und PEDF

Extrazelluläre Glukose ist der wichtigste physiologische Stimulus der Insulinsekretion. Der gestörten Glukose-induzierten Insulinsekretion kommt bei der Entstehung von Diabetes mellitus eine entscheidende Rolle zu [10]. Hier sollte der Einfluss von PEDF auf die Insulinsekretion der β -Zelle analysiert werden.

In der Versuchsreihe ohne PEDF zeigten die Ergebnisse deutliche Anstiege der Insulinsekretion unter Glukosekonzentrationen von 2,5mM mit KCl sowie 24mM um 111% [211,5±24,4%, p=0,044] bzw. 122% [222,3±31,3%, p=0,059] im Vergleich zur niedrigen Glukosekonzentration von 2,5mM ohne KCl. Der Anstieg unter 12mM Glukose um 14% [114,0±11,2%] war nicht signifikant.

In der Versuchsreihe mit PEDF fand sich eine vergleichbare Tendenz. Es waren signifikante, jedoch im Vergleich zur Versuchsreihe ohne PEDF deutlich geringere Anstiege der Insulinsekretion zu verzeichnen. Bei Zugabe von KCl zeigte sich ein Anstieg um 25% [125,1±5,72%, p=0,048], unter Glukosekonzentration von 12mM um 29% [128,9±4,79%, p=0,026] und bei Stimulation mit 24mM Glukose um 48% [148,3±10,88%, p=0,047].

Beim Vergleich der Versuche ohne und mit PEDF waren ebenfalls signifikante Unterschiede feststellbar. Bei niedriger Glukosekonzentration zeigte sich mit PEDF ein Anstieg der Insulinsekretion um 97% [$196,7 \pm 21,55\%$, $p=0,046$]. Auch bei höherer Glukosekonzentration von 12mM und 24mM waren signifikante Steigerungen um 123% [$223,2 \pm 20,24\%$, $p=0,026$] bzw. 32% [$131,9 \pm 4,82\%$, $p=0,022$] nachweisbar. Ein geringer, jedoch nicht signifikanter Anstieg um 17% [$116,6 \pm 5,94\%$, $p=0,11$] konnte bei Stimulation mit KCl gemessen werden.

Glukosekonzentration	Insulingehalt im Medium ohne PEDF	Insulingehalt im Medium mit PEDF
2,5mM	100 ± 0%	196,7 ± 21,6% ($p^b=0,046$)
2,5mM + KCl	211,5 ± 24,4% ($p^a=0,044$)	247,7 ± 34,4% ($p^a=0,048$, $p^b=0,11$)
12mM	114,0 ± 11,2% ($p^a=0,34$)	254,8 ± 33,0% ($p^a=0,026$, $p^b=0,026$)
24mM	222,3 ± 31,3% ($p^a=0,059$)	295,4 ± 48,4% ($p^a=0,047$, $p^b=0,022$)

Tab. 4.1: Beeinflussung der Insulinsekretion in INS-1 Zellen durch PEDF (40nM) bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.

(p^a = Signifikanz gegenüber des Ergebnisses bei 2,5mM Glukose mit bzw. ohne PEDF, p^b = Signifikanz gegenüber dem Ergebnis bei gleicher Glukosekonzentration ohne PEDF)

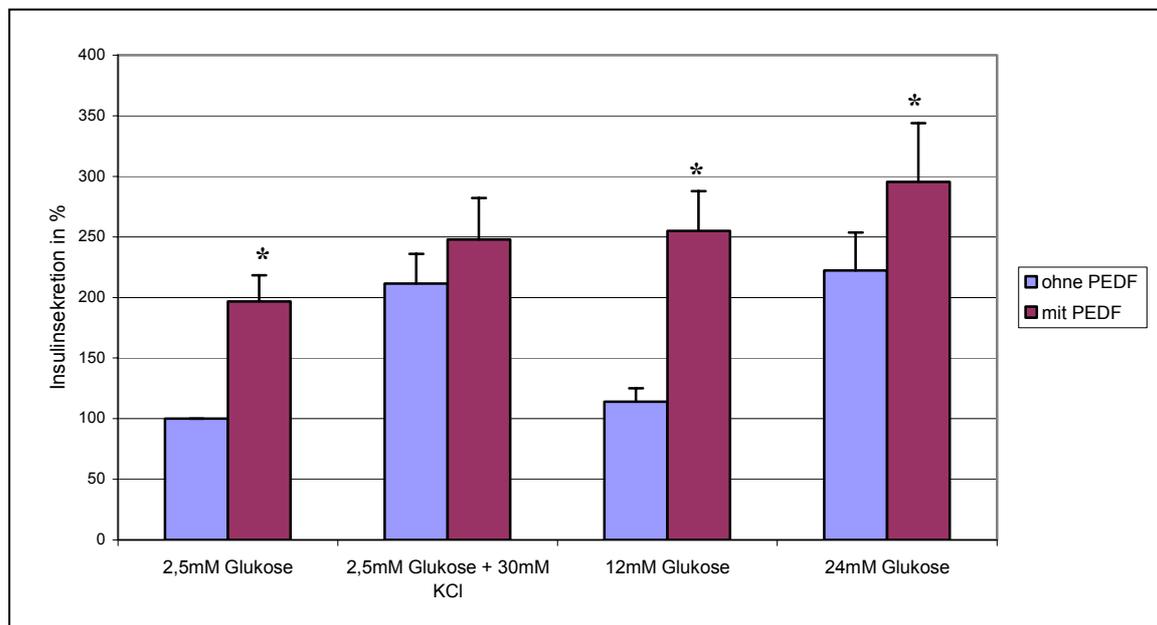


Abb. 4.15: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen.

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

4.2.5 Bestimmung der Expression weiterer β -Zell-Gene

4.2.5.1 Etablierung der RT-PCR

Die Bestimmung der Expression der Transkriptionsfaktoren und β -Zell-Gene erfolgte analog zur Analyse der Insulinexpression mit der semiquantitativen PCR.

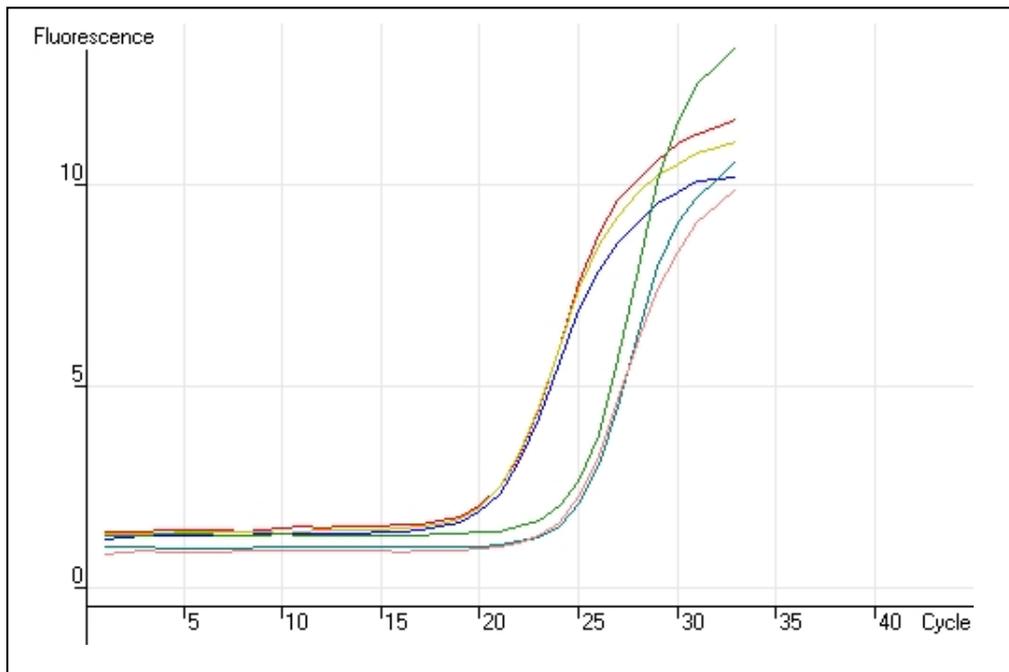


Abb. 4.16a: Darstellung der Standardkurven des amplifizierten Glukokinase-Fragmentes im konzentrierten und einem 5fach verdünnten Ansatz in der RT-PCR.

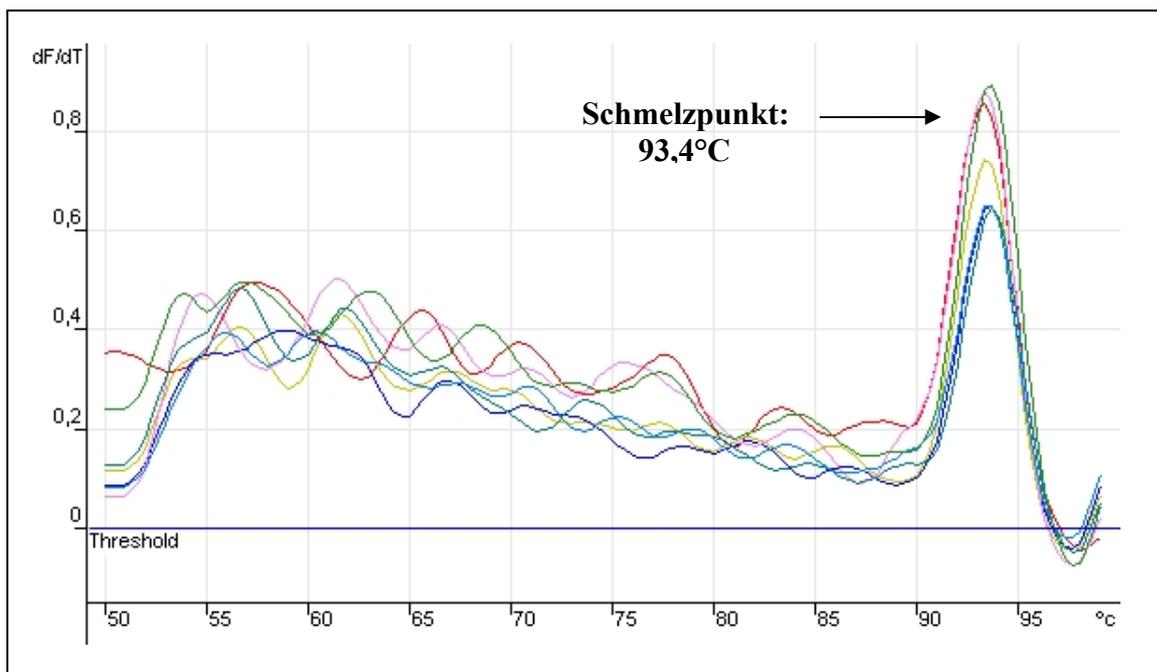


Abb. 4.16b: Darstellung des spezifischen Schmelzpunktes des amplifizierten Glukokinase-Fragmentes.

In der Etablierungsphase der RT-PCR wurde zusätzlich eine Qualitätskontrolle über die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel durchgeführt.

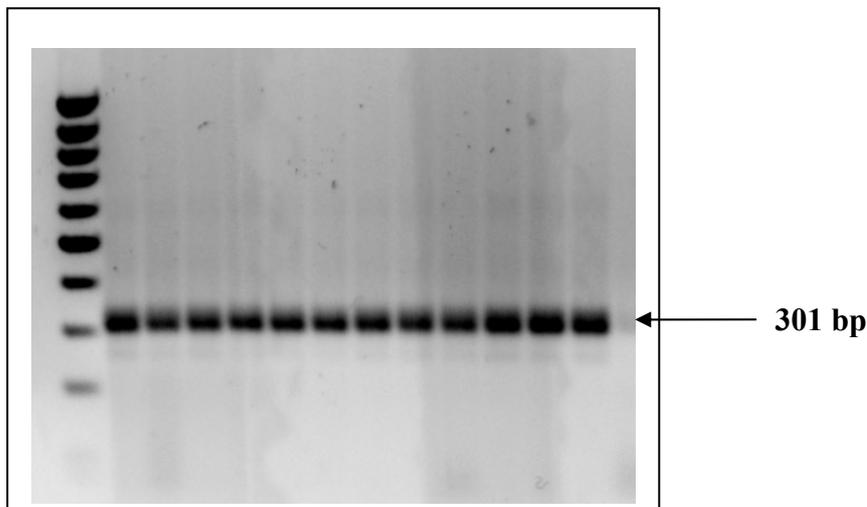


Abb. 4.16c: Darstellung des aus 301 Basenpaaren bestehenden Glukokinase-Fragmentes nach RT-PCR und anschließender Auftrennung in einer 1%igen Agarose-Gelmatrix.

4.2.5.2 Einfluss von Glukose und PEDF auf die Expression verschiedener β -Zell-Gene

Analog zu den Versuchen zur Insulinexpression wurden zur Ermittlung der Beeinflussung der Expression wichtiger β -Zell-Gene durch Glukose und PEDF die INS-Zellen ebenfalls für 48 Stunden mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen stimuliert.

Bei der nachfolgenden Bestimmung der mRNA-Expression von PDX-1 zeigte sich unter Stimulation mit 16,5mM Glukose gegenüber 3mM Glukose ein signifikanter Abfall der Expression um 81% [18,9 \pm 2,89%, p=0,022]. (Abb. 4.18) Unter PEDF war bei niedriger Glukose eine Minderung der Expression von PDX-1 um 24% [75,7 \pm 4,39%, p=0,11] gegenüber den Ansätzen ohne PEDF sichtbar. Währenddessen fand sich bei hoher Glukose eine leichte Steigerung um 10% [110,2 \pm 1,53, p=0,09].

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Bestimmung von Nkx6.1 und HNF4 α festgestellt werden. (Abb. 4.19) Die Auswertungen ergaben, dass bei hoher Glukose die mRNA-Expression von Nkx6.1 um 77% [33,4 \pm 1,2%, p=0,011] und von HNF4 α um 54% [45,9 \pm 1,5%, p=0,018] vermindert war. Durch Inkubation mit PEDF waren sowohl bei niedriger als auch bei hoher Glukose Anstiege der mRNA-Konzentration zu beobachten. So zeigte sich bei 3mM Glukose

eine Steigerung der Expression von Nkx6.1 und HNF4 α um 19% [118,9 \pm 1,4%, p=0,046] bzw. 18% [117,9 \pm 7,6%, p=0,26], bei 16,5mM Glukose um 10% [109,5 \pm 5,8%, p=0,35] bzw. 17% [117,2 \pm 15,0%, p=0,46].

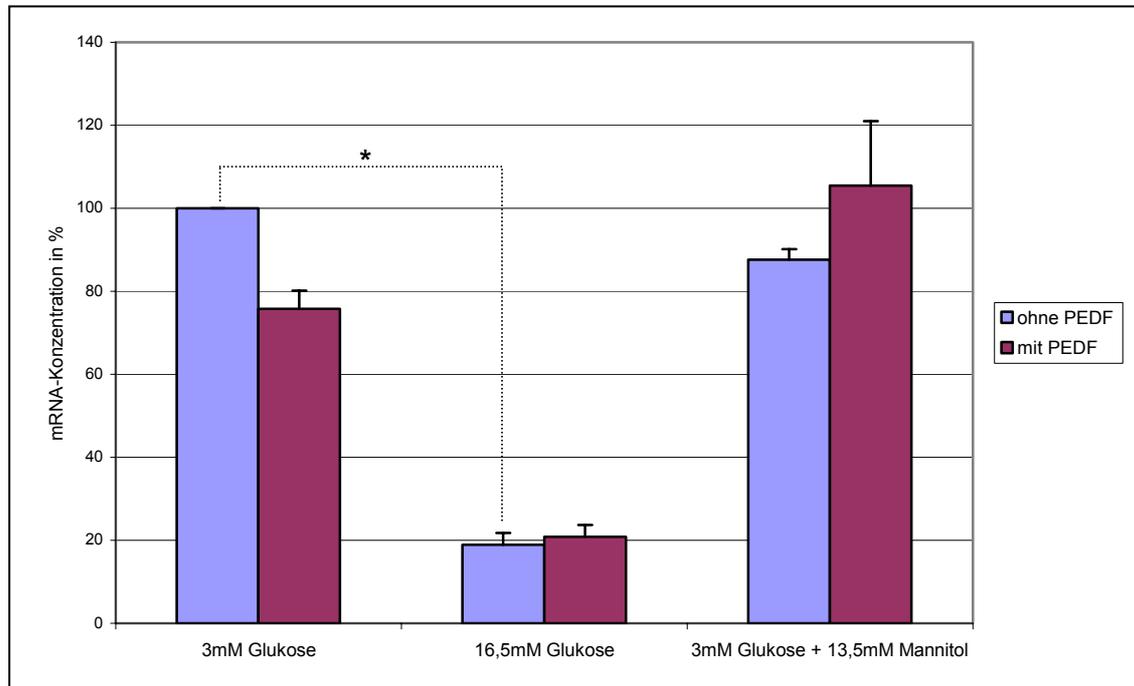


Abb. 4.17: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Expression von PDX-1 in INS-1 Zellen. Die Bestimmung der Expression von PDX-1 erfolgte nach 48 Stunden Inkubation. (Anzahl der Versuche: n=2; * p<0,05)

Bei der Untersuchung von Glukokinase und GLUT2 sowie IAPP waren ebenfalls Resultate vergleichbar mit denen von PDX-1 zu verzeichnen. (Abb. 4.20) Bei hoher Glukose zeigte sich ein signifikanter Abfall der Expression von Glukokinase um 70% [30,2 \pm 5,4%, p=0,049], von GLUT2 um 80% [20,6 \pm 4,8%, p=0,038] und von IAPP um 84% [16,4 \pm 2,8%, p=0,022]. Beim Vergleich der Stimulation mit PEDF und der Ansätze ohne PEDF waren bei 3mM Glukose geringe Steigerungen der Expression unter PEDF feststellbar. Die mRNA-Konzentration stieg bei Glukokinase um 10% [110,1 \pm 0,2%, p=0,012], bei GLUT2 um 4% [103,7 \pm 0,05%, p=0,009] und bei IAPP um 5% [105,0 \pm 2,7%, p=0,31].

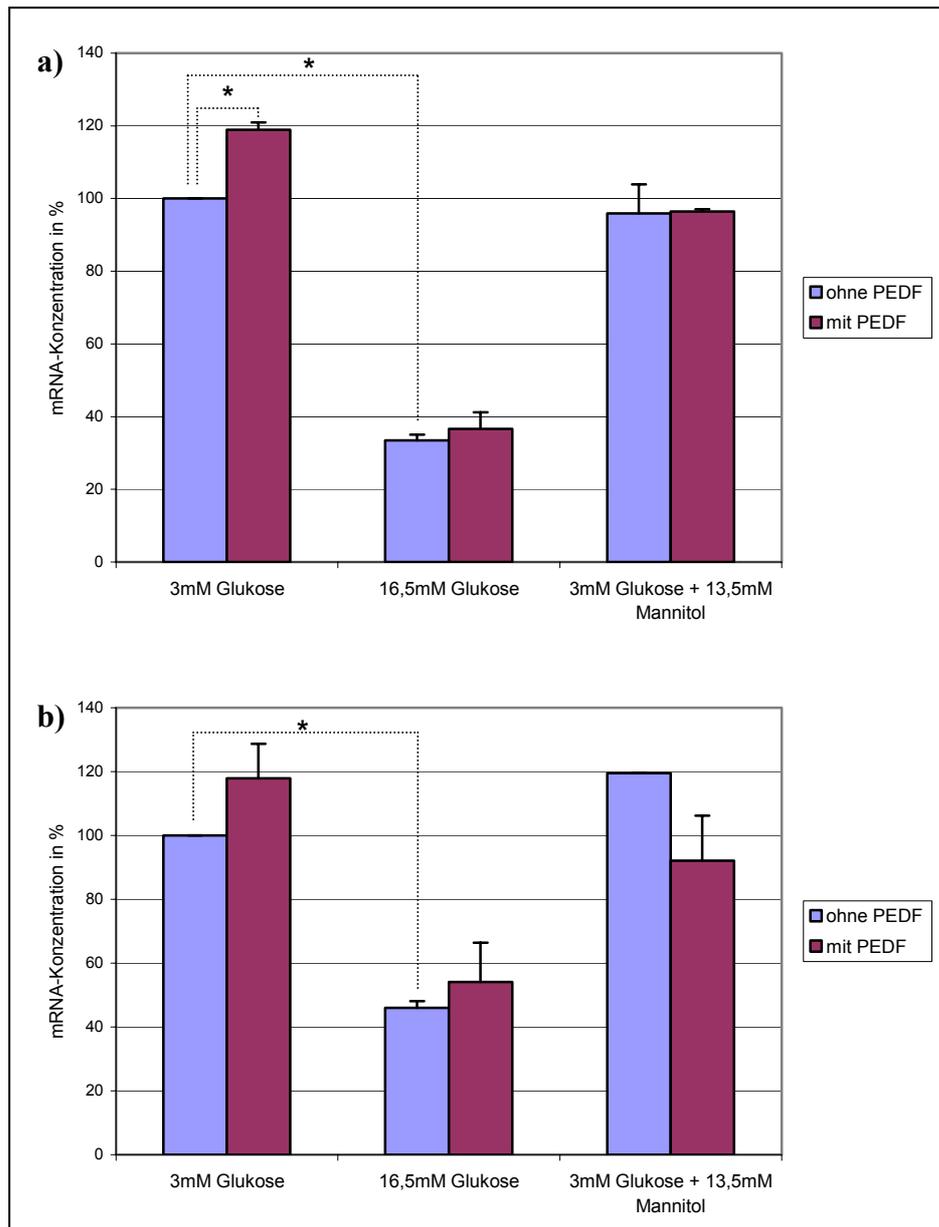


Abb. 4.18: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Expression von Nkx6.1 (a) und HNF4α (b) in INS-1 Zellen.

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

Auch bei hoher Glukose konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden. Es kam ebenfalls zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Die Expression von Glukokinase wurde um 20% [119,7±3,7%, p=0,12] gesteigert, während bei GLUT2 die Steigerung mit 10% [110,0±3,3%, p=0,19] geringer ausfiel. Bei IAPP war eine größere Steigerung um 37% [136,9±22,8%, p=0,32], jedoch mit starker Streuung der Einzelwerte, zu verzeichnen.

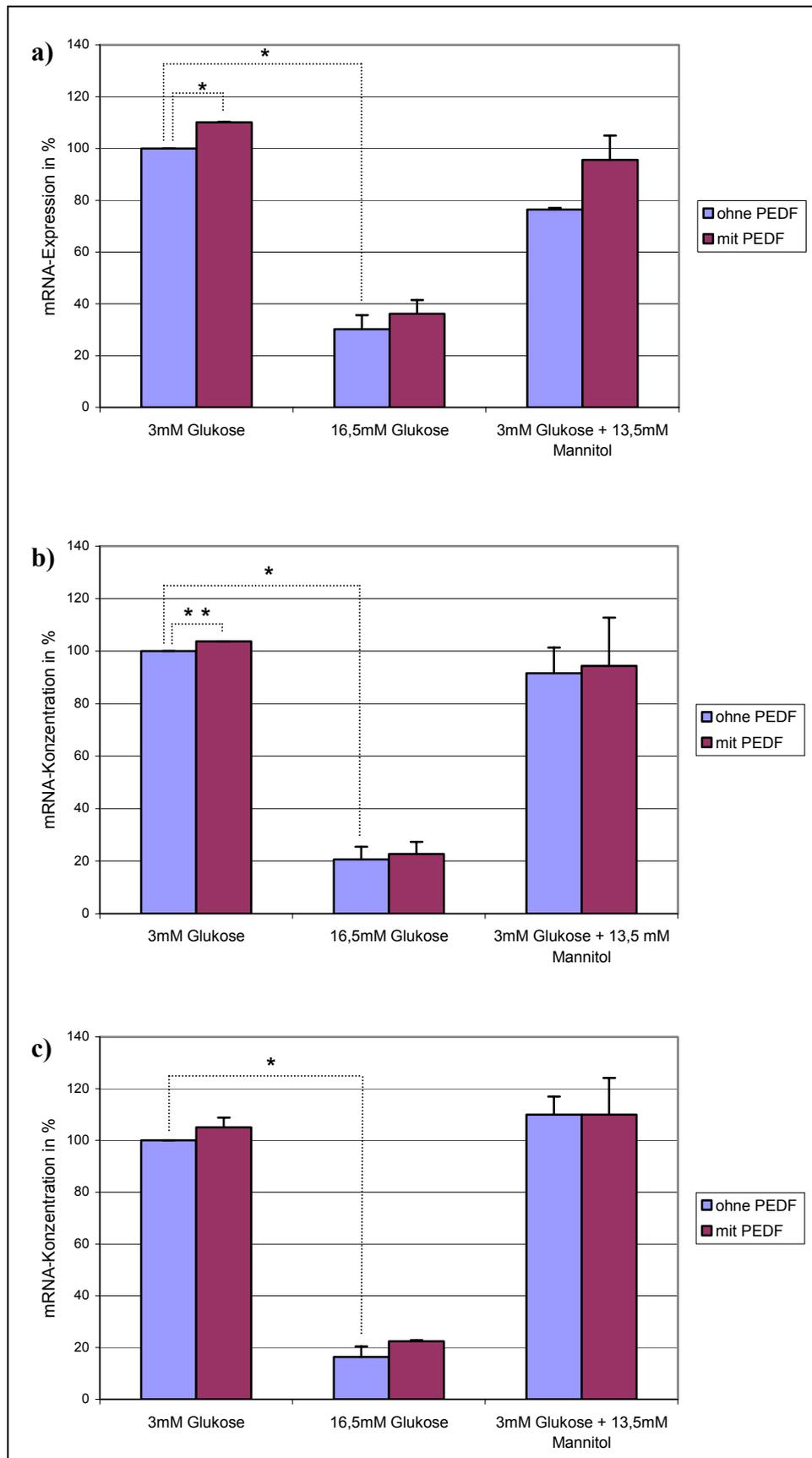


Abb. 4.19: Wirkung von PEDF (40nM) auf die Expression von Glukokinase (a), GLUT2 (b) und IAPP (c) in INS-1 Zellen.
(Anzahl der Versuche: n=2; * p<0,05, ** p<0,01)

5. Diskussion

Inflammatorische Prozesse spielen vermutlich auch bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 eine wesentliche Rolle. In verschiedenen Studien konnte in retinalen Perizyten und Pigmentepithelzellen eine antiapoptotische und eine antiinflammatorische Wirkung von PEDF nachgewiesen werden. Daher sollte in dieser Arbeit ein möglicher Effekt von PEDF auf die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas und deren Metabolismus analysiert werden.

5.1 Nachweis von PEDF in INS-1 Zellen

PEDF wurde ursprünglich als neuroprotektiver Faktor in retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene neurotrophe Faktoren und Wachstumsfaktoren auch in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert werden [112]. So konnte ebenso eine RNA-Expression und Proteinsekretion von PEDF in zahlreichen Geweben, wie Skelettmuskulatur, Knochen, Herz oder Leber, gezeigt werden [68]. Es gelang zusätzlich, PEDF aus dem Blutplasma zu extrahieren [69].

Zunächst wurde daher untersucht, ob PEDF in den β -Zellen des Pankreas exprimiert wird. Als Modell wurden INS-1 Zellen gewählt, da sie relativ gut differenzierte Insulinomzellen sind. Die Morphologie von INS-1 Zellen gleicht derjenigen von primären β -Zellen der Ratte. Sie produzieren Proinsulin 1 und 2 und weisen eine Konversion dieser Vorläufer in Insulin auf, die ebenfalls der in primären Inselzellen der Ratte entspricht. Zusätzlich bleiben diese Zellen über viele Passagen stabil und ändern dabei nicht ihre Charakteristika [95].

Neben vielen anderen Geweben konnte auch im Pankreas bereits eine Genexpression von PEDF nachgewiesen werden [68]. Dieser Nachweis eines PEDF Transkripts war allerdings zelltyp-unspezifisch. Da die Untersuchung mit Pankreasgewebe ohne Auftrennung der einzelnen Zelltypen erfolgte, war eine Zuordnung zu einer bestimmten Zellart nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte direkt für INS-1 Zellen, also insulinproduzierende β -Zellen der Langerhans'schen Inseln, gezeigt werden, dass PEDF mRNA tatsächlich exprimiert wird. Ein PEDF Transkript konnte mittels PCR und anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden.

Der Nachweis von PEDF auf Protein-Ebene in INS-1 Zellen gelang nicht. Weder intrazellulär noch im Zellmedium konnte im Western blot die Expression eines PEDF-Proteins gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass das Protein unter den untersuchten Bedingungen nur in

geringem Maße produziert wird, so dass die vorliegende Methode nicht sensitiv genug war. Sensitivere Nachweisverfahren standen zum Zeitpunkt der Analysen nicht zur Verfügung. Möglicherweise exprimieren die β -Zellen auch kein PEDF-Protein, weil es nicht sinnvoll erscheint, PEDF in größeren Mengen selbst zu produzieren, wenn es im Blutkreislauf zirkuliert [69] oder womöglich von anderen Zellen auf die β -Zellen wirkt.

5.2 Proliferation

Inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1-beta (IL-1 β), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) oder Interferon-gamma (IFN- γ) [105, 113] spielen bei der Störung der β -Zell-Funktion im Rahmen einer Diabetesentstehung vermutlich eine wichtige Rolle. Es konnten Rezeptoren für diese Zytokine in den insulinproduzierenden Zellen des Pankreas nachgewiesen werden [104, 115]. Die proinflammatorischen Zytokine wirken zytotoxisch auf die β -Zellen. Dies scheint über die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) zu erfolgen [106, 116]. In verschiedenen Studien wurde eine Beeinträchtigung der β -Zell-Funktion mit Störung der mitochondrialen Aktivität, verminderter Insulinsekretion und veränderter Expression verschiedener β -Zell-Proteine gezeigt [117]. Ebenso können DNA-Strang-Brüche [118] sowie der β -Zell-Tod induziert werden, wobei eine vermehrte Apoptose als Hintergrund diskutiert wird [106, 116, 119].

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β stimuliert nach Aktivierung der Protein Kinase C [120] und Freisetzung von Ceramiden durch Aktivierung der membranständigen Sphingomyelinase [121] eine Kaskade von Proteinkinasen, u.a. MAPK und JNK [122, 123], und nachfolgend nukleäre Transkriptionsfaktoren, z.B. NF κ B und c-jun [120]. Dies führt zu komplexen Veränderungen der Proteinexpression der β -Zellen [117, 124]. So wird die Expression von PDX-1, GLUT2 und Insulin inhibiert, während Superoxid-Dismutase MnSOD und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) verstärkt exprimiert werden [124, 125].

In der vorliegenden Arbeit diente IL-1 β zur Simulation einer inflammatorisch induzierten Funktionsstörung der β -Zelle. Die Inkubation für 48 h mit IL-1 β verminderte die metabolische Funktion der β -Zellen um bis zu 24%. Diese Wirkung war dosisabhängig. Ab einer Konzentration von 250pg/ml war ein signifikanter hemmender Effekt auf die metabolische Aktivität der β -Zelle feststellbar. Die inhibierende Wirkung von IL-1 β wurde durch Kombination mit TNF- α noch zusätzlich verstärkt. Dieser synergistische Effekt der Kombination verschiedener Zytokine wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet [121, 125].

PEDF hatte unter den hier gewählten Bedingungen scheinbar keinen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt der Zytokine in den INS-1 Zellen. In allen untersuchten Proben mit PEDF war sogar eine gering niedrigere Stoffwechselaktivität gegenüber den Kontrollen ohne PEDF feststellbar. Auch unterschiedliche PEDF-Konzentrationen erbrachten hierbei keine Veränderungen. Ein schützender oder antiinflammatorischer Einfluss, wie er für Perizyten und auch neuronale Zellen bereits beschrieben wurde [126], konnte in den β -Zellen somit nicht festgestellt werden.

Einschränkend muss festgestellt werden, dass Apoptose selbst in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Da die Gesamtzellzahl aus einem Gleichgewicht aus Proliferation und Zelluntergang entsteht, wären theoretisch gegenläufige Veränderungen beider Phänomene denkbar, was in einer unveränderten Gesamtzellzahl resultieren würde.

Freie Sauerstoffradikale sind an der Vermittlung von entzündlichen Reaktionen beteiligt [127]. Bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 entstehen sie im Rahmen einer vermehrten Glukoseverfügbarkeit bei der mitochondrialen Verstoffwechslung. Sauerstoffradikale werden als ein möglicher Mechanismus bei der Entstehung von glukotoxischen Zellschäden angesehen. [107, 128]. Andererseits scheinen sie die Zytokin-induzierte Zytotoxizität durch Aktivierung von NF κ B zu regulieren [129].

Das hier als Modell verwendete Hydrogenperoxid (H_2O_2) senkte die Stoffwechselaktivität und Zellzahl der INS-1 Zellen konzentrationsabhängig um bis zu 30%. Parallel zu den vorherigen Versuchen mit IL-1 β war in allen Ansätzen mit PEDF eine geringe Minderung der Stoffwechselaktivität feststellbar. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass PEDF eine Hemmung der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose an retinalen Perizyten und Pigmentepithelzellen bewirkt [79, 126]. Der apoptotische Effekt der Peroxide konnte dabei durch PEDF zeit- und dosisabhängig inhibiert werden [130]. Diese protektive Wirkung von PEDF war in INS-1 Zellen nicht nachweisbar, vergleichbar zu den Ergebnissen mit inflammatorischen Zytokinen.

Zusammengefasst waren damit in den durchgeführten Versuchen keine Hinweise auf eine eventuelle Schutzfunktion von PEDF gegenüber proinflammatorischen Zytokinen und oxidativem Stress in den insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas nachweisbar.

Die insulinsezernierenden β -Zellen des Pankreas sind hochspezialisierte Zellen. Ihre postnatale Teilungsrate ist gering [131]. Trotzdem ist die β -Zell-Masse eine dynamische Einheit mit einer beachtlichen Kapazität, sich dem jeweiligen Insulinbedarf anpassen zu können [132]. Dies wird

durch Proliferation und Neogenese der β -Zellen sowie deren Apoptose realisiert [131, 133]. Es konnten verschiedene Hormone und Stoffwechselmetaboliten, unter anderem IGF-1, GLP-1 und Glukose, identifiziert werden, die Proliferation und Apoptose der β -Zellen sowie deren Differenzierung und Funktion beeinflussen [134, 135, 136].

Glukose wurde als Wachstumsfaktor bereits in verschiedenen Studien charakterisiert [108, 137]. Bei hoher Glukose kann der Organismus die Proliferation der β -Zellen verstärken, um den erhöhten Bedarf an Insulin zu kompensieren. Diese mitogene Wirkung konnte in den durchgeführten Versuchen ebenfalls bestätigt werden. Nach 96stündiger Inkubation unter hyperglykämischen Bedingungen von 16,5mM Glukose wurde eine Steigerung der Zahl an β -Zellen um 77% gegenüber der Kontrolle erreicht. Andere In vitro-Studien ermittelten sogar eine noch stärkere proliferationsfördernde Wirkung durch Glukose. Cousin et al. zeigten bei 15mM Glukose über 24 Stunden bereits eine Verdoppelung der Zellzahl [138].

PEDF wird dagegen eine antiproliferative Wirkung zugesprochen. Dies wurde bereits in verschiedenen Studien für unterschiedliche Zelllinien gezeigt [87, 109, 139]. Ein ähnlicher Effekt wurde für β -Zellen bisher nicht untersucht. In INS-1 Zellen ist lediglich eine Stimulation der Proliferation durch VEGF erwiesen [140]. Eine proliferationshemmende Wirkung von PEDF könnte im Rückschluss vermutet werden. Diese erwartete Hemmung der β -Zell-Proliferation konnte in den durchgeführten Untersuchungen tatsächlich bestätigt werden. Nach 120 Stunden war eine signifikante Minderung der Zellzahl unter Stimulation mit PEDF gegenüber dem Ansatz ohne PEDF um 17% bzw. 27% feststellbar. Eine zusätzliche Messung nach 7 Tagen mit einer Zellzahlminderung um bis zu 41% im MTS-Assay gegenüber dem Kontrollansatz bekräftigte diesen Trend. Auch in den Versuchen mit proinflammatorischen Zytokinen und Peroxiden zur Simulation einer induzierten Apoptose war bei Inkubation mit PEDF eine Minderung der Stoffwechselaktivität im MTS-Assay messbar. Dieses Ergebnis kann somit ebenfalls durch den proliferationshemmenden Effekt von PEDF erklärt werden. Insgesamt besteht also auch in den β -Zellen des Pankreas eine antiproliferative Wirkung von PEDF.

5.3 β -Zell-Funktion

5.3.1 Expression von Insulin und weiterer β -Zell-Gene

Insulin ist von essentieller Bedeutung für die metabolische Homöostase. Die Regulation der Blutglukose ist abhängig von der Insulinexpression und -sekretion der β -Zellen des Pankreas. Eine Vielzahl an Faktoren, Hormonen und Signaltransduktionsmolekülen beeinflusst die Insulinexpression, und damit die β -Zell-Funktion, positiv oder negativ [110]. Um einen möglichen Einfluss von PEDF auf die Funktion der β -Zelle zu spezifizieren, wurden neben der Expression von Insulin auch andere β -Zell-Gene untersucht. Analysiert wurden dabei einige Gene, deren Defekt zu Formen des MODY-Diabetes führen kann, so der Transkriptionsfaktor PDX-1, Glukokinase und exemplarisch für die Gruppe der HNF's das HNF4 α . Zusätzlich sollten noch der Transkriptionsfaktor Nkx6.1, das β -Zell-Hormon IAPP sowie GLUT2 als Glukosetransporter und weiteres Enzym des Glukosemechanismus untersucht werden.

Der vollständige molekulare Mechanismus der Aktivierung der Insulin-Genexpression in den β -Zellen ist noch nicht verstanden. Der Insulinpromoter enthält mehrere Regionen, an denen aktivierende Transkriptionsfaktoren binden können. [141] Die am besten charakterisierten Faktoren sind die bHLH-(basic helix loop helix)-Proteine NeuroD/BETA2 und E47, der Transkriptionsfaktor RIPE3b1, inzwischen identifiziert als bZIP-Protein MafA, sowie das Homeodomainprotein PDX-1. E47 und NeuroD/BETA2, welches spezifisch in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird, bilden ein Heterodimer und binden an die E-Elemente des Insulinpromotors [141, 142]. MafA bindet an das C1-Element [141, 143]. PDX-1 stimuliert die Insulinexpression an A-Elementen des Insulinpromotors mit der gemeinsamen Sequenz TAAT [47, 58]. Diese genannten Faktoren können schließlich synergistisch die Aktivierung der Transkription des Insulingens bewirken [142, 143, 144]. Die genauen Interaktionen sind jedoch noch nicht im Einzelnen beschrieben.

Der wichtigste physiologische Regulator der Insulin-Genexpression in den β -Zellen des Pankreas ist Glukose. Kurzzeitige Glukosestimulation führt zur Steigerung der Insulinexpression [145]. Chronische Hyperglykämie beeinträchtigt dagegen sowohl die Insulin Gentranskription als auch die Insulinsekretion auf dramatische Weise [146, 147, 148]. Ähnliches ist von PDX-1 bekannt. Erhöhte extrazelluläre Glukose aktiviert über Signalwege, an denen MAPK und PI-3-Kinase

beteiligt zu sein scheinen, die Phosphorylierung und Transaktivierung von PDX-1 [56, 57, 58]. Nach Transaktivierung wird, u.a. durch GLP-1 vermittelt [57], die Translokation in den Zellkern induziert, wo PDX-1 an die A-Elemente des Insulinpromoters bindet [47, 58]. Zusätzlich ist auch eine Bindung von PDX-1 an das GG2-Element des Promoters beschrieben [149]. Während es bei akuter Hyperglykämie zu einer Steigerung der PDX-1 Expression kommt, wird unter chronisch supraphysiologischer Glukosekonzentration dagegen eine verminderte Expression und Bindungsaktivität von PDX-1 beobachtet [111, 147]. Dies trägt zur Minderung der Insulintranskription bei. Die Minderung der Bindungsaktivität von PDX-1 und MafA scheint einen Mechanismus der Glukotoxizität auf die Insulin-Genexpression aufzuzeigen [150]. Somit kann auch die Minderung der Insulinexpression bei chronischer Stimulation mit erhöhter Glukosekonzentration über den Signalweg von PDX-1 erklärt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigen [111, 151]. Sowohl bei Stimulation mit supraphysiologischer Glukosekonzentration über 48 Stunden als auch mit verlängerter Inkubationszeit von 120 h zeigte sich eine signifikante Verminderung der Insulin-Genexpression. Analog zu den hier präsentierten Ergebnissen beobachteten Olson et al. einen Abfall der Insulinexpression bei erhöhter Glukose um etwa 80% [111]. Die hier gewählten Inkubationsbedingungen mit Glukosekonzentrationen von 3mM und 16,5mM erschienen im Vergleich mit anderen Studien [111, 145] sinnvoll. Bei der Messung der PDX-1 Expression zeigte sich eine Minderung in gleichem Ausmaß wie bei den Untersuchungen der Insulinexpression. Wie bereits oben beschrieben, lässt sich die Minderung der Insulinexpression also mit der Reduktion der Genexpression von PDX-1 erklären.

Auch die Reduktion der Expression weiterer β -Zell-Gene kann in Zusammenhang mit dem Abfall der Expression von PDX-1 gebracht werden. PDX-1 ist Transaktivator verschiedener β -Zell-spezifischer Gene und kann durch Bindung an spezifische Promoterregionen die Transkription von GLUT2, GK und IAPP aktivieren [47, 49]. Während GLUT2 der Aufnahme der Glukose in die β -Zelle dient [34], steuert Glukokinase über die Phosphorylierung der Glukose die Glykolyse [36]. Bei Hyperglykämie kann der Organismus durch verstärkte Aktivierung der Expression beider Gene die Ausschüttung von Insulin steigern [37]. Bei anhaltend hoher Glukosekonzentration kommt es hingegen zur Hemmung der Expression beider Gene [152, 153]. IAPP ist ein Peptid aus 37 Aminosäuren und Mitglied der Calcitonin-Gen-Familie [154]. Es befindet sich gemeinsam mit Insulin in den Sekretionsgranula der β -Zellen und wird zusammen mit dem Insulin ausgeschüttet [155]. Die physiologische Funktion von IAPP ist bisher weitgehend ungeklärt. Eine relevante Rolle in der Regulation des Glukosemetabolismus

wird diskutiert [154, 155]. Die Genexpression von IAPP erfolgt glukoseabhängig. Dies wird über PDX-1 durch Bindung an einen Promoter ähnlich der Promoterregion des Insulins vermittelt [48, 154, 156]. IAPP wird also nach Stimulation mit Glukose verstärkt exprimiert [156]. Chronische Hyperglykämie hatte in der vorliegenden Studie einen ähnlichen Abfall der Expression zur Folge wie bei PDX-1. Jonas et al. [152] stellten dagegen unterschiedliche Auswirkungen der Hyperglykämie in Abhängigkeit vom Ausmaß fest. Während bei geringer Hyperglykämie die Expression noch leicht gesteigert wurde, konnte bei starker Hyperglykämie eine Minderung nachgewiesen werden.

Auch bei der Untersuchung der Expression von Nkx6.1 war unter supraphysiologischer Glukosekonzentration, parallel zu den Resultaten von PDX-1, ein signifikanter Abfall zu beobachten. Nkx6.1 ist von elementarer Bedeutung für die endokrine Entwicklung des Pankreas [157]. Es besitzt außerdem eine regulierende Funktion für die Glukose-induzierte Insulinsekretion [158]. Möglicherweise sind diese Ergebnisse ebenfalls durch die Minderung der PDX-1 Expression zu erklären. PDX-1 scheint auch hier über Bindung an den Nkx6.1 Promoter die Transkription zu steuern [51, 158].

HNF-4 α als Transkriptionsfaktor der Kernrezeptor-Subfamilie der ‚hepatocyte transcription factors‘ reguliert, ähnlich dem PDX-1, die Expression verschiedener am Glukosemetabolismus beteiligter Gene. So wird die Transkription des Glukosetransporters GLUT2 sowie der glykolytischen Enzyme Aldolase B und L-Pyruvatkinase durch HNF-4 α moduliert [61, 62, 159]. HNF-4 α kann die Insulinexpression auch über direkte Wirkung am Insulinpromoter aktivieren [141, 160]. Zusätzlich bildet HNF-4 α , zusammen mit HNF-1 α und HNF-3 β ein komplexes Geflecht von Transkriptionsfaktoren, welches von grundlegender Bedeutung für die Funktion der β -Zelle ist [60]. Auch die Expression von HNF-4 α zeigte sich in den hier durchgeführten Versuchen bei Exposition chronischer Hyperglykämie signifikant vermindert, resultierend in einem reduzierten Glukosestoffwechsel.

Verschiedene Studien [14, 152, 153] demonstrierten die Auswirkungen chronischer Hyperglykämie auf die β -Zellen und die damit verbundene Reduktion des Differenzierungsgrades. Zum Nachweis wurde die Bestimmung der verschiedenen β -Zell-Gene benutzt. In der vorliegenden Studie konnten die im Tiermodell nach Pankreatektomie [152] und mit diabetischen Mäusen (db/db) [153] erbrachten Ergebnisse im Zellversuch mit INS-1 Zellen bestätigt werden. Insgesamt waren hier unter hyperglykämischen Bedingungen sowohl die Expression der Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung der β -Zelle und Aufrechterhaltung ihrer Funktion verantwortlich sind, als auch die mRNA-Menge der für die

Glukose-induzierte Insulinsekretion wesentlichen Gene signifikant reduziert. Die Ergebnisse von GLUT2, GK, IAPP und Nkx6.1 sind offensichtlich dabei ebenso wie die Minderung der Insulinexpression im Zusammenhang mit den Veränderungen von PDX-1 zu interpretieren, da PDX-1 die Expression der genannten Gene direkt oder indirekt reguliert. Grundsätzlich existiert ein Netzwerk sich gegenseitig regulierender und modulierender Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf weitere Enzyme der β -Zell-Funktion, der Insulinexpression und der Glukose-induzierten Insulinsekretion. In diesem Netz scheint PDX-1 eine maßgebliche Rolle zu spielen. Die vorliegenden Ergebnisse betrachtend, deutet die Minderung der Expression der Transkriptionsfaktoren PDX-1 und Nkx6.1, die für die endokrine Entwicklung und Differenzierung der β -Zelle bedeutsam sind, auf eine Minderung des Differenzierungsgrades unter Einwirkung chronischer Hyperglykämie hin. Eine Reduktion der mRNA-Menge von Insulin, GLUT2, Glukokinase, IAPP und HNF4 α zeigt die verminderte Aktivität des Glukosestoffwechsels, wodurch ebenfalls auf einen Verlust der Differenzierung geschlossen werden könnte.

PEDF wurde zunächst in retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen. Dort konnte demonstriert werden, dass PEDF die neuronale Differenzierung der Retinoblastoma-Zellen bewirkt [67]. In der vorliegenden Studie gelang der Nachweis der mRNA-Expression von PEDF in INS-1 Zellen. Und auch eine mögliche differenzierende Wirkung von PEDF in β -Zellen bzw. eine aktivierende Wirkung auf den β -Zell-Metabolismus kann diskutiert werden. Sowohl in der Untersuchung der Insulinexpression als auch bei der Analyse der anderen β -Zell-Gene waren, insbesondere bei supraphysiologischer Glukosekonzentration, Steigerungen der Genexpression nachweisbar. Zeigte sich bei Inkubation der INS-1 Zellen mit selbständig transfiziertem PEDF über 48 h noch ein eher geringer Effekt, fand sich bei verlängerter Inkubationszeit nach Stimulation über 5 Tage bei hoher Glukosekonzentration eine stabile und signifikante Erhöhung der Insulin mRNA-Expression. Mit kommerziell erworbenem rekombinanten PEDF konnte eine Steigerung um 200% beobachtet werden.

Bei der Untersuchung der Expression der weiteren β -Zell-Gene war ebenfalls ein steigernder Effekt durch Stimulation mit PEDF erkennbar. Dies gilt insbesondere unter hyperglykämischen Bedingungen. PEDF konnte in den durchgeführten Versuchen die Hemmung der Expression der untersuchten Gene nicht vollständig blockieren. Jedoch zeigte sich in allen Versuchen eine Reduktion der expressionshemmenden Wirkung der Hyperglykämie. Die Ergebnisse waren aufgrund der geringen Probenzahlen jedoch nicht signifikant.

Alles in allem scheint PEDF eine verstärkte Expression der für den Metabolismus der β -Zelle wichtigen Gene zu bewirken, was wiederum als Steigerung der Differenzierung der INS-1 Zellen verstanden werden kann.

5.3.2 Insulinsekretion

Die β -Zelle des Pankreas sezerniert Insulin in Abhängigkeit vom Glukose-Level im Blut [46, 164]. Glukose bewirkt die Stimulation der Produktion von ATP, GTP und cAMP, was zu einer Depolarisation der Zellmembran und zum Einstrom von Ca^{2+} führt [38, 39]. Dies triggert schließlich die Exozytose von Insulin [41, 42]. Innerhalb eines Normbereiches führt eine Erhöhung der Glukosekonzentration zu einer Steigerung der Insulinsekretion [45, 46].

Zusätzlich hat Glukose auch einen wesentlichen Einfluss auf die Expression für die Insulinsekretion ausgesprochen wichtiger Gene. So kann eine akute Hyperglykämie die verstärkte Expression von GLUT2 [35] und Glukokinase [37] bewirken. Durch die erhöhte Expression des Glukosetransporters und des Schlüsselenzyms der Glukoseverstoffwechslung ist somit ebenfalls eine Steigerung der Insulinsekretion möglich.

In der vorliegenden Arbeit war unter hyperglykämischen Bedingungen von 24mM eine Verdopplung der Insulinsekretion gegenüber physiologischer Glukosekonzentration feststellbar. Die Stimulation mit 30mM KCl bei niedriger Glukose bewirkte ebenfalls eine Verdopplung der Insulinsekretion. Dies kann durch eine Depolarisation der β -Zell-Membran infolge der akuten Hyperkaliämie erklärt werden, wodurch es zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle und letztlich zur verstärkten Insulinantwort kommt [46, 165].

Ähnlich den Untersuchungen zur Insulinexpression hatte PEDF auch einen steigernden Effekt auf die Insulinsekretion. Die Inkubation mit PEDF führte in allen Proben zu einer Zunahme der Sekretion. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen von 2,5mM und 12mM fanden sich sogar Steigerungen um etwa 100%. Da die Messungen als Endpunktmessungen durchgeführt wurden, erfolgte keine Berücksichtigung der Zellzahl. In Anbetracht der bereits beschriebenen proliferationshemmenden Wirkung von PEDF und der somit zu erwartenden geringeren Zellzahl kann eine noch stärkere Steigerung der Insulinsekretion pro einzelne Zelle vermutet werden.

Die Messungen der Expression der β -Zell-Gene zeigten, wie oben beschrieben, unter Stimulation mit PEDF eine verstärkte Expression der Gene des Glukosemetabolismus GLUT2 und Glukokinase. Auch PDX-1 und Nkx6.1, für die bereits ein positiv regulierender Effekt auf die

Insulinsekretion beschrieben wurde [158, 166, 167], waren bei Exposition von PEDF verstärkt exprimiert worden. Auch die Ergebnisse der Insulinsekretion sprechen für eine Steigerung der β -Zell-Funktion durch PEDF und hängen möglicherweise mit einer Steigerung der Differenzierung zusammen.

5.3.3 Differenzierung

Eine dedifferenzierende Wirkung chronischer Hyperglykämie ist bereits vielfach beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise für eine Dedifferenzierung der INS-1 Zellen unter chronisch hyperglykämischen Bedingungen dargelegt werden. So war einerseits die Expression aller untersuchten β -Zell-Gene vermindert. Auf der anderen Seite zeigte sich ein starker proliferationsfördernder Effekt chronischer Hyperglykämie. Ein möglicher Ansatz zur Erklärung der Dysfunktion der β -Zellen während der Manifestation des Diabetes mellitus wäre somit der proliferationsinduzierte Verlust des Differenzierungsgrades der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas. Von zentraler Bedeutung könnte dabei der Transkriptionsfaktor PDX-1 sein, da er direkt eine Vielzahl von Genen reguliert, die für die β -Zell-Funktion und -Identität wichtig sind [47, 49]. Von verschiedenen Autoren wird eine entscheidende Beteiligung von PDX-1 am Mechanismus der Glukotoxizität diskutiert [111, 147, 150].

Während die chronische Hyperglykämie scheinbar eine Dedifferenzierung der INS-1 Zellen induziert [152, 153], bewirkt PEDF möglicherweise gegenteilig eine Steigerung der Differenzierung der INS-1 Zellen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Insulinexpression und -sekretion deuten darauf hin, dass PEDF die Stoffwechselfunktion der INS-1 Zellen modifiziert. Sowohl bei Insulinexpression und -sekretion als auch bei der Bestimmung der Expression der β -Zell-Gene waren Steigerungen durch Stimulation mit PEDF nachweisbar. Dies weist auf eine potentielle Erhöhung des Differenzierungsgrades durch PEDF hin. Auch in Makrophagen und Mikroglia konnte bereits eine Steigerung der metabolischen Aktivität durch PEDF nachgewiesen werden [109, 139]. In Retinoblasten bewirkte PEDF eine erhöhte Expression neuronaler Markermoleküle wie der Neuron-spezifischen Enolase und des Neurofilament-Proteins [67].

Einen weiteren Anhalt dafür, dass PEDF eine Auswirkung auf die Differenzierung der INS-1 Zellen hat, könnten die Ergebnisse der Untersuchung der Proliferation darstellen. Unter Stimulation mit PEDF war eine signifikante Hemmung der Proliferation sichtbar. Da die

Erhöhung des Differenzierungsgrades mit einer Minderung der Proliferationsrate einhergeht, kann auch die antiproliferative Wirkung von PEDF auf die INS-1 Zellen als ein Hinweis auf eine mögliche Förderung der Differenzierung interpretiert werden.

Zusammengefasst ließ sich der initial vermutete protektive Effekt von PEDF, wie er bereits mehrfach in neuronalen Zellen demonstriert werden konnte, in den INS-1 Zellen so nicht nachweisen. In den Untersuchungen ließ sich weder unter zytotoxischem noch oxidativem Stress eine Schutzwirkung unter Stimulation mit PEDF darstellen. Insgesamt scheint PEDF aber eine Differenzierung der β -Zellen zu bewirken. Möglicherweise kann PEDF somit nicht nur eine neuronale Differenzierung induzieren [67], sondern besitzt eine generelle differenzierende Wirkung auf unterschiedliche Zellarten. Um eine allgemeine diesbezügliche Aussage treffen zu können, bedarf es jedoch zunächst weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Erkenntnisse über eine mögliche Bedeutung von PEDF für die Funktion der β -Zelle des Pankreas sowie bei der Entstehung des Diabetes mellitus gewonnen werden. In verschiedenen neuronalen Zellarten ist bereits ein antiapoptotischer Effekt von PEDF beobachtet worden. Da an der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 vermutlich ebenfalls eine progrediente Apoptose der β -Zellen beteiligt ist, sollte eine potentielle Schutzwirkung von PEDF untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte in INS-1 Zellen erstmalig eine Genexpression von PEDF nachgewiesen werden. Der Nachweis von PEDF auf Proteinebene gelang, möglicherweise aufgrund einer geringen physiologischen Proteinsynthese, mit den vorhandenen Methoden nicht.

Die Stimulation der INS-1 Zellen mit PEDF führte zu einer Hemmung der Proliferation.

Weiterhin kam es durch PEDF zu einer Modifikation der Expression einzelner β -Zell-Gene. Sowohl Insulin als auch die untersuchten Transkriptionsfaktoren PDX-1, HNF-4 α und Nkx6.1 und Gene des Glucosemetabolismus, wie GLUT2, Glukokinase und IAPP, wurden unter Stimulation mit PEDF verstärkt exprimiert. Zusätzlich zeigte sich eine Steigerung der Insulinsekretion.

Eine antiapoptotische Wirkung, wie sie in früheren Studien für neuronale Zellen nachgewiesen wurde, konnte in den INS-1 Zellen für PEDF nicht gezeigt werden. Ein solcher protektiver Effekt war weder bei zytotoxischem noch oxidativem Stress darstellbar.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse von Proliferation, Genexpression und Insulinsekretion eine steigernde Wirkung von PEDF auf den Differenzierungsgrad der INS-1 Zellen vermuten. Bei bereits vorliegendem Nachweis differenzierender Eigenschaften in anderen Zellarten wäre eine generelle Funktion als differenzierungsfördernder zellulärer Faktor zu diskutieren.

7. Literaturverzeichnis

- 1 American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl1:S43-8.
- 2 Wong FS, Du W, Thomas IJ, et al. The influence of the Major Histocompatibility Complex on Development of Autoimmune Diabetes in RIP-B7.1 Mice. *Diabetes* 2005;54:2032-40.
- 3 Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1994;331:1428-36.
- 4 Filippi C, von Herrath M. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cell Immunol.* 2005;233:125-32.
- 5 Faideau B, Larger E, Lepault F, et al. Role of beta-cells in type 1 diabetes pathogenesis. *Diabetes* 2005;54 Suppl2:S87-96.
- 6 Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, et al. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 2001;50:1269-73.
- 7 Tree TI, O'Byrne D, Tremble JM, et al. Evidence for recognition of novel islet T cell antigens by granule-specific T cell lines from new onset type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol.* 2000;121:100-5.
- 8 Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, et al. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* 2005;54 Suppl2:S52-61
- 9 Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev.* 1998;19:491-503.

- 10 Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365:1333-46.
- 11 Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 2005;307:373-5.
- 12 Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23:599-622.
- 13 Mauvais-Jarvis F, Virkamaki A, Michael MD, et al. A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:2126-34.
- 14 Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 2001;50 Suppl1:S154-9.
- 15 Leibowitz G, Yuli M, Donath MY, et al. Beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001;50 Suppl1:S113-7.
- 16 Robertson RP, Harmon J, Tran PO, et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003;52:581-7.
- 17 Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002;110:851-60.
- 18 Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, et al. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* 2005;54:3238-44.
- 19 Biden TJ, Robinson D, Cordery D, et al. Chronic effects of fatty acids on pancreatic beta-cell function: new insights from functional genomics. *Diabetes* 2004;53 Suppl1:S159-65.
- 20 Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, et al. Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 2001;50:315-21.

- 21 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-25.
- 22 Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;328:1676-85.
- 23 Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2005;54:3252-7.
- 24 Haffner SM. Coronary heart disease in patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2000;342:1040-2.
- 25 Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229-34.
- 26 American Diabetes Association: Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl1:S79-83.
- 27 Malone JI, Morrison AD, Pavan PR, et al. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2001;24:522-6.
- 28 Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2004;350:48-58.
- 29 Fong DS, Aiello L, Gardner TW, et al; American Diabetes Association. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl1:S84-7.
- 30 Llewelyn JG. The diabetic neuropathies: types, diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74 Suppl2:ii15-ii19.
- 31 Obrosova IG, Li F, Abatan OI, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes* 2004;53:711-20.

- 32 Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, et al; American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28:956-62.
- 33 Bloomgarden ZT. Diabetic retinopathy and neuropathy. *Diabetes Care* 2005;28:963-70.
- 34 Wu L, Fritz JD, Powers AC. Different functional domains of GLUT2 glucose transporter are required for glucose affinity and substrate specificity. *Endocrinology* 1998;139:4205-12.
- 35 Waeber G, Thompson N, Haefliger JA, et al. Characterization of the murine high Km glucose transporter GLUT2 gene and its transcriptional regulation by glucose in a differentiated insulin-secreting cell line. *J Biol Chem.* 1994;269:26912-9.
- 36 Zelent D, Najafi H, Odili S, et al. Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:306-10.
- 37 Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 2002;51 Suppl3:S394-404.
- 38 Wollheim CB, Maechler P. Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 2002;51 Suppl1:S37-42.
- 39 Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 2001;414:807-12.
- 40 Remedi MS, Koster JC, Patton BL, et al. ATP-sensitive K⁺ channel signaling in glucokinase-deficient diabetes. *Diabetes* 2005;54:2925-31.
- 41 Bhattacharjee A, Whitehurst RM Jr, Zhang M, et al. T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *Endocrinology* 1997;138:3735-40.

- 42 Rorsman P, Eliasson L, Renström E, et al. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci.* 2000;15:72-77.
- 43 Gromada J, Hoy M, Renström E, et al. CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1999;518:745-59.
- 44 Osterhoff M, Möhlig M, Schwanstecher M, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta2 regulates gene expression of insulin in INS-1 rat insulinoma cells. *Cell Calcium* 2003;33:175-84.
- 45 Frödin M, Sekine N, Roche E, et al. Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem.* 1995;270:7882-9.
- 46 Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000;49:1751-60.
- 47 McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 2001;44:1203-14.
- 48 Serup P, Jensen J, Andersen FG, et al. Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9015-20.
- 49 Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol.* 2002;146:129-41.
- 50 Sander M, Sussel L, Connors J, et al. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 2000;127:5533-40.

- 51 Watada H, Mirmira RG, Leung J, et al. Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J Biol Chem.* 2000;275:34224-30.
- 52 Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, et al. Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J Biol Chem.* 2001;276:25279-86.
- 53 Gremlich S, Bonny C, Waeber G, et al. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem.* 1997;272:30261-9.
- 54 Gauthier BR, Brun T, Sarret EJ, et al. Oligonucleotide microarray analysis reveals PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J Biol Chem.* 2004;279:31121-30.
- 55 Peshavaria M, Henderson E, Sharma A, et al. Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol.* 1997;17:3987-96.
- 56 Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett.* 1998;431:362-6.
- 57 Wang X, Zhou J, Doyle ME, et al. Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology* 2001;142:1820-7.
- 58 Macfarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, et al. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 1999;274:1011-6.
- 59 Macfarlane WM, Shepherd RM, Cosgrove KE, et al. Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca²⁺. *Diabetes* 2000;49:418-23.

- 60 Yamagata K. Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J.* 2003;50:491-9.
- 61 Ryffel GU. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Mol Endocrinol.* 2001;27:11-29.
- 62 Wang H, Maechler P, Antinozzi PA, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *Biol Chem.* 2000;275:35953-9.
- 63 Kulkarni RN, Kahn CR. HNFs – linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science* 2004;303:1311-2.
- 64 Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, et al. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J Biol Chem.* 2001;276:17533-40.
- 65 Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:628-36.
- 66 Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, et al. Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci.* 2002;22:9378-86.
- 67 Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res.* 1991;53:411-4.
- 68 Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis.* 1996;2:11.

- 69 Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J.* 2003;374:199-206.
- 70 Pignolo RJ, Cristofalo VJ, Rotenberg MO. Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G0 state. *J Biol Chem.* 1993;268:8949-57.
- 71 Palmieri D, Watson JM, Rinehart CA. Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Exp Cell Res.* 1999;247:142-7.
- 72 Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, et al. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci.* 1995;15:4992-5003.
- 73 Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ. Analysis of EPC-1 growth state-dependent expression, specificity, and conservation of related sequences. *J Cell Physiol.* 1995;162:110-8.
- 74 Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, et al. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem.* 1995;270:25992-9.
- 75 Tombran-Tink J, Aparicio S, Xu X, et al. PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J Struct Biol.* 2005;151:130-50.
- 76 Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, et al. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1526-30.
- 77 Simonovic M, Gettins PG, Volz K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:11131-5.

- 78 Tombran-Tink J, Pawar H, Swaroop A, et al. Localization of the gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF) to chromosome 17p13.1 and expression in cultured human retinoblastoma cells. *Genomics* 1994;19:266-72.
- 79 Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, et al. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res.* 1999;57:789-800.
- 80 Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, et al. Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem.* 1995;64:2509-17.
- 81 Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, et al. Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem.* 1997;68:26-32.
- 82 Araki T, Taniwaki T, Becerra SP, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J Neurosci Res.* 1998;53:7-15.
- 83 Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:719-28.
- 84 DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, et al. Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 1999;56:604-10.
- 85 Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 1999;274:31605-12.
- 86 Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem.* 2006;281:38022-37

- 87 Yabe T, Wilson D, Schwartz JP. NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 2001;276:43313-9.
- 88 Yabe T, Kanemitsu K, Sanagi T, et al. Pigment epithelium-derived factor induces pro-survival genes through cyclic AMP-responsive element binding protein and nuclear factor kappa B activation in rat cultured cerebellar granule cells: Implication for its neuroprotective effect. *Neuroscience* 2005;133:691-700.
- 89 Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol.* 2004;164:1225-32.
- 90 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245-8.
- 91 Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:821-9.
- 92 Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, et al. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2593-7.
- 93 Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, et al. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 2001;50:2641-5.
- 94 Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med.* 2003;9:774-80.
- 95 Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci.* 2005;77:3231-41.

- 96 Asfari M, Janjic D, Meda P, et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992;130:167-78.
- 97 Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991;3:207-12.
- 98 Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;51:187-200.
- 99 Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.
- 100 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 101 Kabir S, Rajendran N, Urushigawa Y, et al. Interference of contaminating DNA in the quantification of a toluene-induced *tod* gene in *Pseudomonas putida*. *J Biosci Bioeng.* 2003;96:250-6.
- 102 Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:1700-7.
- 103 Ortego J, Escribano J, Becerra SP, et al. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2759-67.
- 104 Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996;39:1005-29.
- 105 Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol.* 1998;55:1139-49.

- 106 Mauricio D, Mandrup-Poulsen T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* 1998;47:1537-43.
- 107 Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 1999;274:27905-13.
- 108 Sjöholm A. Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes* 1997;46:1141-7.
- 109 Cohen J, Sugita Y, Chader GJ, et al. Recombinant forms of the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor activate cellular metabolism and inhibit proliferation of the RAW macrophage cell line. *Neuroimmunomodulation* 2000;7:51-8.
- 110 Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 2002;45:309-26.
- 111 Olson LK, Qian J, Poitout V. Glucose rapidly and reversibly decreases INS-1 cell insulin gene transcription via decrements in STF-1 and C1 activator transcription factor activity. *Mol Endocrinol.* 1998;12:207-19.
- 112 Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58:1061-6.
- 113 Freiesleben De Blasio B, Bak P, Pociot F, et al. Onset of type 1 diabetes: a dynamical instability. *Diabetes* 1999;48:1677-85.
- 114 Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol.* 1999;163:5770-80.
- 115 Kägi D, Ho A, Odermatt B, et al. TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. *J Immunol.* 1999;162:4598-605.

- 116 Steer SA, Scarim AL, Chambers KT, et al. Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med.* 2006;3:e17:253-266
- 117 Larsen PM, Fey SJ, Larsen MR, et al. Proteome analysis of interleukin-1beta--induced changes in protein expression in rat islets of Langerhans. *Diabetes* 2001;50:1056-63.
- 118 Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, et al. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 1997;138:2610-4.
- 119 Saldeen J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 2000;141:2003-10.
- 120 Carpenter L, Cordery D, Biden TJ. Protein kinase Cdelta activation by interleukin-1beta stabilizes inducible nitric-oxide synthase mRNA in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2001;276:5368-74.
- 121 Major CD, Gao ZY, Wolf BA. Activation of the sphingomyelinase/ceramide signal transduction pathway in insulin-secreting beta-cells: role in cytokine-induced beta-cell death. *Diabetes* 1999;48:1372-80.
- 122 Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, et al. Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1998;273:15294-300.
- 123 Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, et al. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000;49:1468-76.
- 124 Ling Z, Van de Casteele M, Eizirik DL, et al. Interleukin-1beta-induced alteration in a beta-cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 2000;49:340-5.

- 125 Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, et al. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1 β -induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest.* 1998;101:1811-20.
- 126 Amano S, Yamagishi S, Inagaki Y, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2005;69:45-55.
- 127 Tiedge M, Lortz S, Munday R, et al. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 1998;47:1578-85.
- 128 Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, et al. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 1999;514:471-81.
- 129 Li Q, Engelhardt JF. Interleukin-1 β induction of NF κ B is partially regulated by H₂O₂-mediated activation of NF κ B-inducing kinase. *J Biol Chem.* 2006;281:1495-505.
- 130 Tsao YP, Ho TC, Chen SL, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced cell death by activation of extracellular signal-regulated kinases in cultured retinal pigment epithelial cells. *Life Sci.* 2006;79:545-50.
- 131 Bonner-Weir S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol.* 2000;24:297-302.
- 132 Bonner-Weir S. Beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 2001;50 Suppl1:S20-4.
- 133 Lipsett M, Finegood DT. Beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 2002;51:1834-41.
- 134 Hügl SR, White MF, Rhodes CJ. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin

- receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem.* 1998;273:17771-9.
- 135 Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, et al. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes* 2001;50 Suppl1:S25-9.
- 136 Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 2004;145:2653-9.
- 137 Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 2000;141:1926-9.
- 138 Cousin SP, Hügl SR, Myers MG Jr, et al. Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J.* 1999;344:649-58.
- 139 Sugita Y, Becerra SP, Chader GJ, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has direct effects on the metabolism and proliferation of microglia and indirect effects on astrocytes. *J Neurosci Res.* 1997;49:710-8.
- 140 Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 1998;139:1494-9.
- 141 Hay CW, Docherty K. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes* 2006;55:3201-13.
- 142 Qiu Y, Guo M, Huang S, et al. Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol.* 2002;22:41220.

- 143 Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, et al. Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J.* 2005;389:813-20.
- 144 Glick E, Leshkowitz D, Walker MD. Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *J Biol Chem.* 2000;275:2199-204.
- 145 Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, et al. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem.* 1985;260:13585-9.
- 146 Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, et al. Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 1999;48:1230-6.
- 147 Sharma A, Olson LK, Robertson RP, et al. The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol.* 1995;9:1127-34.
- 148 Poitout V, Olson LK, Robertson RP. Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest.* 1996;97:1041-6.
- 149 Le Lay J, Stein R. Involvement of PDX-1 in activation of human insulin gene transcription. *J Endocrinol.* 2006;188:287-94.
- 150 Poitout V, Hagman D, Stein R, et al. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 2006;136:873-6.
- 151 Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, et al. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 2000;49:532-6.

- 152 Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem.* 1999;274:14112-21.
- 153 Kjørholt C, Akerfeldt MC, Biden TJ, et al. Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* 2005;54:2755-63.
- 154 Carty MD, Lillquist JS, Peshavaria M, et al. Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 1997;272:11986-93.
- 155 Hull RL, Westermark GT, Westermark P, et al. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3629-43.
- 156 Macfarlane WM, Campbell SC, Elrick LJ, et al. Glucose regulates islet amyloid polypeptide gene transcription in a PDX1- and calcium-dependent manner. *J Biol Chem.* 2000;275:15330-5
- 157 Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 2005;146:1025-34.
- 158 Schisler JC, Jensen PB, Taylor DG, et al. The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7297-302.
- 159 Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13209-14.
- 160 Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, et al. Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem.* 2002;277:25914-9.

- 161 Kelpke CL, Moore PC, Parazzoli SD, et al. Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem.* 2003;278:30015-21.
- 162 Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, et al. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 2005;280:32413-8.
- 163 Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, et al. Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology* 1999;140:4005-14.
- 164 Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, et al. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 2002;51 Suppl1:S60-7.
- 165 Yamazaki H, Zawalich KC, Zawalich WS. Desensitization of the pancreatic beta-cell: effects of sustained physiological hyperglycemia and potassium. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:H1381-7.
- 166 Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, et al. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2002;277:11225-32.
- 167 Nakajima-Nagata N, Sugai M, Sakurai T, et al. Pdx-1 enables insulin secretion by regulating synaptotagmin 1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318:631-5.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Spranger und Herrn Prof. Dr. Andreas F. H. Pfeiffer für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung derselben.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Joachim Spranger für die wissenschaftliche Begleitung während der experimentellen Arbeit. Seine umfassende und freundliche Betreuung hat wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Die gemeinsamen Gespräche haben mich stets vorangebracht. Herrn Prof. Dr. Andreas F. H. Pfeiffer danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung der Laboratorien. Ich möchte mich auch für seine jederzeit offene Art in den Gesprächen und Diskussionen bedanken.

Weiterhin danke ich der Abteilung Klinische Ernährung des DiFE, wobei ich mich bei jedem Einzelnen für seine Unterstützung und die gute Atmosphäre im Labor bedanken möchte. Vielleicht habe ich es deshalb so lange bei euch ausgehalten. Stellvertretend danke ich hier Uta Wegewitz und Isabel Göhring für ihre Hilfsbereitschaft, ihre wertvollen Ratschläge und die ertragreichen Diskussionen. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Martin Osterhoff für die technische Hilfeleistung und Betreuung bedanken.

Letztlich danke ich natürlich besonders meinen Eltern, die mir dies erst ermöglicht haben, für ihre immer währende Unterstützung und den unermüdlichen Antrieb. Und ich danke meiner Familie, meiner Frau und meiner Tochter, die jeden Tag für mich da sind, mich stets ermuntern haben und mir die trüben und einsamen Stunden beim Grübeln zu dieser Arbeit immer wieder erhellen.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, André Kutz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Funktionelle Untersuchung des Pigment epithelium derived factor (PEDF) in β -Zellen des endokrinen Pankreas** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift