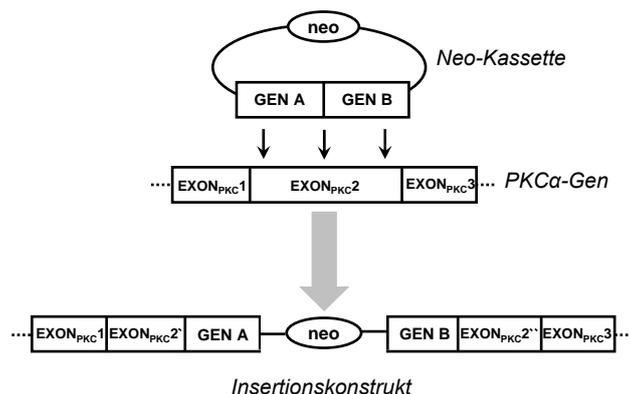


## 2. Materialien und Methoden

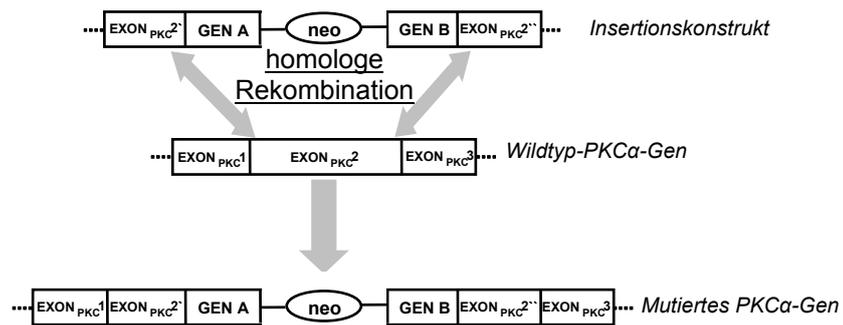
### 2.1 cPKC-Knockout im Maus-Modell

Die Mäusestämme mit fehlender Expression von PKC-Isoformen (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ ) wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Leitges (Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover) bereitgestellt. Die genaue Vorgehensweise beim Herbeiführen der PKC $\alpha$ - bzw. PKC $\beta$ -Defizienz wird in einer ganzen Reihe von Veröffentlichungen dargestellt (Leitges et al., 2002; Leitges et al., 1996; Liu et al., 2004). Im Weiteren soll die prinzipielle Vorgehensweise am Beispiel der PKC $\alpha$ -defizienten Maus skizziert werden. Zunächst wurde ein DNA-Insertionskonstrukt hergestellt, welche zusätzlich zur gewünschten Mutation auch eine neomycin-Kassette enthält (*targeting vector*) (**Abb. 2.1a**). Durch die Unterbrechung der PKC-Gen-Sequenz durch



**Abb. 2.1a** Erstellung eines Insertionskonstruktes, welcher als Markierung eine neo-Kassette im zweiten Exon des PKC $\alpha$ -Gens enthält, und dadurch die Transkription unmöglich macht.

die neomycin-Kassette wird die weitere Transkription unterbrochen. Der entstandene *targeting vector* wurde in die ES der Maus electroporiert, und die erfolgte homologe Rekombination (**Abb. 2.1b**) unter Anwendung von Southern blot in den neomycin-resistenten Kolonien nachgewiesen. Die neo-positiven, für die PKC $\alpha$ -Expression heterozygoten ES wurden in die Blastocysten einer NMRI Maus injiziert. Bei den entstandenen F<sub>0</sub>-Tieren handelte es sich um Chimären mit normalen wie auch genetisch veränderten Zellen, je nach Einnistungsstelle der gentechnisch veränderten ES in den



**Abb. 2.1b** Die embryonalen Stammzellen wurden mit *targeting vector* electroporiert, die gewünschte Insertion erfolgte über die homologe Rekombination. Hierdurch wird die Transkription des Gens in den Zellen unmöglich.

Blastocysten. Die F<sub>0</sub>-Mäuse mit veränderten Keimbahnzellen wurden mit SV/129 Tieren gekreuzt, bei der hierbei entstandenen F<sub>1</sub>-Generation handelte es sich um die heterozygoten transgenen Tiere auf reinem SV/129 background. Erst bei der F<sub>2</sub>-Generation entstanden Mäuse, die homozygot für die Mutation waren. Diese Mäuse wurden für die Etablierung des PKC $\alpha$ -defizienten Stammes verwendet. Der Nachweis der fehlenden PKC $\alpha$ -Expression wurde mit RT-PCR-Nachweis in unterschiedlichen Gewebeproben erbracht.

## 2.2 Isolation der primären pankreatischen $\beta$ -Zellen der Maus

Zunächst erfolgte die Isolation der Langerhansschen Inseln. Die zu präparierende Maus wurde durch Genickbruch getötet, das Fell mit Ethanol (70%) desinfiziert und anschließend die Maus auf der Präparationsfläche befestigt. Nach Abpräparation des Fells und des Bauchfells wurden der Magen und die Leber dargestellt. Die Mündung des Ductus choledochus im Duodenum wurde aufgesucht und collagenasehaltige Puffer-Lösung (2ml) infundiert (1,1 mg Collagenase, 135 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,28 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 3 mM Glukose, 1g/L BSA, mit O<sub>2</sub> begast und auf pH 7,41 eingestellt). Daraufhin wurde das Pankreasgewebe freipräpariert und in einem Glasgefäß mit einer zusätzlichen Menge der collagenasehaltigen Puffer-Lösung bei 37°C im Wasserbad geschüttelt.

Nach einer Zeitspanne zwischen 6 und 8 Minuten unter optischer Kontrolle wurde die Verdauung durch die Zugabe einer eiskalten collagenasefreien Pufferlösung unterbrochen. Die entstandene Suspension wurde bei 600 Umdrehungen/min eine Minute lang abzentrifugiert, dekantiert und mit frischer Pufferlösung wieder vermengt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die entstandene Suspension wurde in eine Petrischale gegeben, die Inseln unterm Lichtmikroskop in eine zweite Petrischale aussortiert. Die Inseln wurden über die ganze Zeit mit Eis gekühlt.

Im nächsten Schritt wurden die aussortierten Inseln in die einzelnen  $\beta$ -Zellen aufgetrennt. Man sammelte die abgezählten Inseln in ein separates Eppendorfhüttchen und zentrifugierte dieses bei 800 Umdrehungen/min für zwei Minuten. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, man vermischte die Inseln im calciumfreien Puffer (135 mM NaCl, 5,6 KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 3 mM Glukose, 1g/L BSA, 1mM EGTA, begast mit 100% O<sub>2</sub>, pH 7,4) und inkubierte bei Zimmertemperatur über 10 Minuten, um die Desintegration der Inseln in die einzelnen Zellen zu erreichen. Die Suspension wurde daraufhin bei 400 Umdrehungen/min für eine Minute zentrifugiert und wieder dekantiert.

Die nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Inseln wurden im 0.5 ml RPMI-Medium resuspendiert [RPMI 1640: 5,5 mM Glukosehaltig, 10% FBS, 1% Penicillin + Streptomycin], und in einer eingengten Glaspipette in die einzelnen Zellen mechanisch aufgebrochen. Die entstandene feinzellige Suspension wurde erneut bei 800 Umdrehungen/min für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipetiert, durch frisches RPMI-Medium ersetzt und homogenisiert. Die Suspension wurde auf die unbeschichteten Glasplättchen gleichmäßig verteilt. Die Glasplättchen wurden in den Petrischalen über 8 Stunden im Brutschrank (95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) bei 37°C inkubiert, um das Anheften der  $\beta$ -Zellen zu ermöglichen, ehe man die Petrischalen mit 1.5 ml RPMI-Medium auffüllte und innerhalb von 36 Stunden für die Calcium-Messungen verwendete.

### **2.3 Das Anwendungsprinzip von Fluoreszenzfarbstoffen zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in der Zelle**

Für die Messungen der intrazellulären Calcium-Konzentration kann man die sogenannten calciumsensitiven Farbstoffe (dyes) verwenden, die über folgende Eigenschaften verfügen müssen:

- minimale Wechselwirkungen mit den zellulären Vorgängen
- gute Zellgängigkeit der Substanzen
- die Möglichkeit der non-invasiven Messung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration
- hohe Selektivität der Bindung an die  $Ca^{2+}$ -Ionen gegenüber anderen mono- und bivalenten Ionen

Zu diesem Zweck wurden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe wie Quin-2, Indo-1, Fura-2 und Fura-3 entwickelt, die unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen (Hayashi and Miyata, 1994). In unserer Arbeitsgruppe verwendeten wir vorwiegend den Fura-2-Fluoreszenzfarbstoff, die in der Arbeitsgruppe unter Berücksichtigung obengenannter Vorgaben entwickelt wurde (Tsien et al., 1985). Fura-2 wirkt als Chelator, der intrazelluläres Calcium bindet, wobei eine  $Ca^{2+}$ -induzierte Verschiebung des Exzitationsspektrums bei dem gleich bleibenden Emissionsmaximum von 510 nm auftritt. In Abhängigkeit davon, ob ein  $Ca^{2+}$ -Fura-2-Komplex vorliegt, oder ob Fura-2 ungebunden ist, verschiebt sich die Exzitationswellenlänge von 340 nm ( $Ca^{2+}$ -Fura-2-Komplex) auf 380 nm (Fura-2 ungebunden). Da die beiden Werte in einem ständigen Gleichgewicht sich befinden, kann aus dem Verhältnis (Ratio, R) beider Fluoreszenzintensitäten der Calciumgehalt der Zelle errechnet werden, ohne daß die intrazelluläre Farbstoffkonzentration den Wert beeinträchtigt. Hierbei muss aber eine gerätspezifische Kalibrierung durchgeführt werden, die weiter unten beschrieben wird.

Bei den heute üblicherweise verwendeten Fura-2-Zubereitungen handelt es um die zellgängigen Fura2-Acetoxymethyl-(AM)-Ester, die aufgrund der apolaren Struktur die Zellmembran leicht überwinden können. Intrazellulär werden Fura-2/AM-Moleküle von den Esterasen abgebaut, wodurch die  $Ca^{2+}$ -sensitiven freien Fura-2-Säuren sich intrazellulär anreichern. Dadurch lassen sich die Zellen relativ unkompliziert mit ausreichenden Mengen von Fura-2/AM beladen. Obwohl auch diese Substanz gewisse Einschränkungen

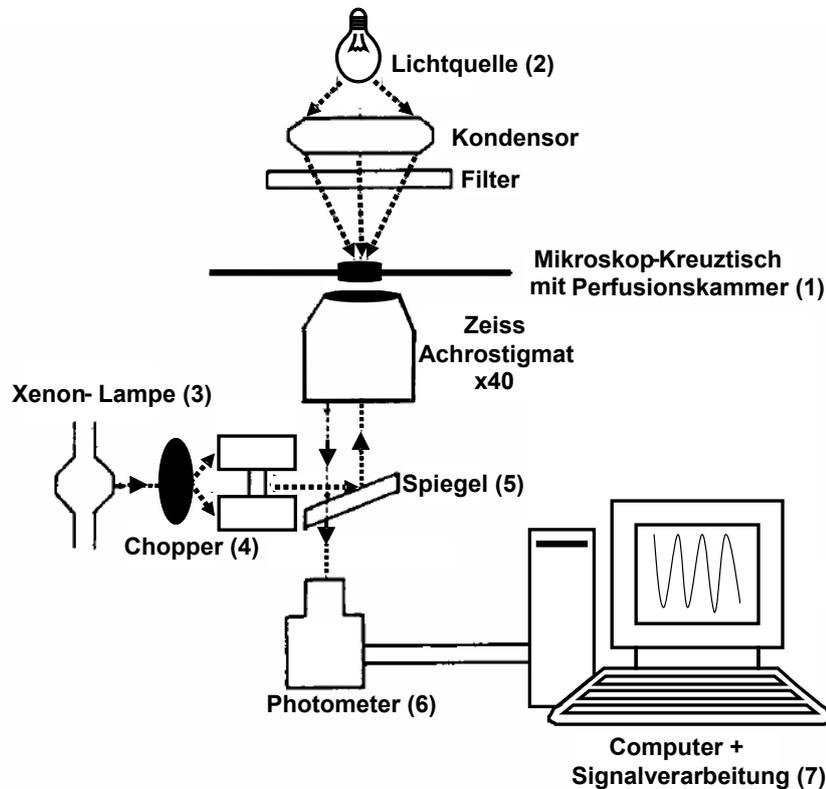
besitzt, wie der unvollständige Abbau von Esterformen in einigen Zelltypen, die Akkumulation des Farbstoffes in den Zellorganellen und die Pufferung des intrazellulären Calciums (Hayashi and Miyata, 1994), sind diese doch bei den in dieser Arbeit verwendeten niedrigen Farbstoff-Konzentrationen und nativen  $\beta$ -Zellen von unterordneter Bedeutung, so daß die Vorteile dieses calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes die Nachteile bei weitem überwiegen.

#### **2.4 Messung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Für die Messungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde das RPMI-Medium gegen den Beladungspuffer ausgetauscht, welches das  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM enthielt, und die Zellen über 30 min inkubiert. Der Beladungspuffer bestand neben einer isotonen Pufferlösung (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glukose, 20 mM HEPES-Na, pH 7,4) aus 5  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM, 0,1% Pluronsäure und 2% BSA.

Die Zugabe der Pluronsäure wie auch der hohen BSA-Konzentration wird zur Verbesserung der Membranpermeabilität von Fura-2/AM verwendet, zusätzlich wird die Kompartimentalisierung von Fura-2 in den Zellorganellen reduziert (Malgaroli et al., 1987). Im Anschluss an die Beladung wurden die zellhaltigen Glasplättchen mit der Pufferlösung (incl. 0,1% BSA) gewaschen, und dann bei der Zimmertemperatur abgedunkelt aufbewahrt, um sowohl das Ableichen des Farbstoffes wie auch den aktiven Transport von Fura-2/AM aus den Zellen zu verhindern. Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu messen, wurden die Glasplättchen in einer Perfusionskammer mit Kammervolumen von ca. 500 $\mu\text{L}$  (Intracel, Royston Herts, GB) eingesetzt, welche die kontrollierte Temperatur von 37°C und eine gleichmäßige Perfusion von 1ml/min ermöglichte. Die Kammer wurde in die Halterung auf dem Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Axiovert IM 135) ausgestattet mit einem 40x Achrostigmat Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Jena) fixiert. Die repräsentativ ausgewählten Zellen (mittelgroß, keine Zellmembranstörungen, gleichmäßige Beladung) wurden für die Messungen verwendet. Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in einzelnen Zellen erfolgte mit einem

Spektralfluoreszenzmessgerät (Deltascan 4000, PTI, Wedel). Der schematische Aufbau des Geräts wird in **Abb. 2.2** dargestellt.



**Abb. 2.2** Schematische Demonstration des Spektralfluoreszenzmessgeräts. Isolierte Zellen werden mit  $5\mu\text{M}$  Fura-2/AM beladen. Die zu untersuchende  $\beta$ -Zelle wird in der Perfusionskammer (1) eingestellt, die auf dem Kreuztisch des mit einem Zeiss Achrostat x40 Objektiv ausgerüsteten Inversionsmikroskops montiert wurde. Zur Betrachtung der Zellen wird eine Kaltlichtquelle (2) benutzt. Eine 75W Xenon-Lampe (3) emittiert das UV-Licht auf den sich rotierenden Chopper (4), welcher das Licht auf die beiden Emissionsmonochromatoren umleitet. Es werden zwei Wellenlängen emittiert (345 und 380 nm), welche auf die  $\beta$ -Zelle umgeleitet werden (5) und das intrazellulär aufgenommene Fura-2 anregen. Hierbei wird bestimmte Wellenlänge (510 nm) emittiert und von einem Photometer (6) gemessen. Die Digitalisierung und Verarbeitung des Signals erfolgt an einem angeschlossenen Computersystem (7).

Aus den bei den Anregungswellenlängen 345 nm und 380 nm gemessenen Emissionsintensitäten wurde nach folgender Formel die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration errechnet (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times B \times (R - R_{\text{MIN}}) / (R_{\text{MAX}} - R),$$

R = der aus der Differenz zweier Fluoreszenz-Intensitäten (345 und 380 nm) abgeleitete Quotient,  $R_{\text{MIN}}$  = der Fluoreszenz-Quotient von Fura-2 in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen,  $R_{\text{MAX}}$  = der Fluoreszenz-Quotient bei gesättigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen,  $K_D$  = die Dissoziationskonstante von Fura-2 und B = der Fluoreszenz-Quotient von der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und  $\text{Ca}^{2+}$ -gesättigten Fura-2 Form bei 380 nm.  $K_D$ -Wert für Fura-2 wurde mit 227 nM angenommen, die Konstanten B,  $R_{\text{MAX}}$ ,  $R_{\text{MIN}}$  wurden anhand von 1  $\mu\text{M}$  Fura-2 Kalibrationslösungen mit unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bestimmt. Die Autofluoreszenz der Zellen wurde als Korrekturfaktor bei der Messung der Intensitäten um 345 und 380 nm berücksichtigt.

## 2.5 Materialien

Bei den Salzen, die für die Herstellung von Puffern verwendet wurden, handelte es sich um bei der Fa. Sigma-Aldrich, Seelze gekaufte reine Substanzen.

Die genetisch veränderte Tiere (PKC $\alpha$ -defiziente Mäuse: Stamm 129S/Sv; PKC $\beta$ -defiziente Mäuse: Stamm C57/BI-6) stammen von der Arbeitsgruppe Dr. Leitges, die entsprechenden Kontrolltiere wurden bei den Firmen Charles River, Wilmington, MA (C57/BI-6) und Harlan Winkelmann, Borcheln (129S/Sv) erworben. Bei der Zubereitung von Puffern und Reaktionsmedien wurden zusätzlich folgende Substanzen angewendet:

BSA	Sigma-Aldrich, Seelze
Carbachol	Sigma-Aldrich, Seelze
Collagenase A	Serva, Heidelberg
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich, Seelze
FCS	Sigma-Aldrich, Seelze
Fura-2	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe

Nifedipin	Sigma-Aldrich, Seelze
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pluronsäure	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Thapsigargin	Alamone Labs, Jerusalem, Israel

## 2.6 Statistik

Bei der Auswertung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurden nach Beginn der Stimulation der Maximalwert des  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufstrichs und die Höhe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach 300 Sekunden (Plateau-Phase) bestimmt. *Area under the curve* (AUC) wurde zur Beschreibung des veränderten Gesamtumsatzes des Calciums in der Zelle nach Stimulation verwendet. Der AUC-Wert wurde über 420 Sekunden ausgegeben, der Wert des basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Umsatzes wurde subtrahiert.

Alle angegebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM). Die Signifikanz wurde mit dem *Student's t-Test* für gepaarte und ungepaarte Werte nachgewiesen. Bei den Abbildungen von den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spuren handelt es sich um repräsentative Originalmessdaten.